



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR *CAMPYLOBACTER* SPP. EM PEITOS DE  
FRANGO EMBALADOS EM ATMOSFERA PROTECTORA E EM SUPERFÍCIES DO  
AMBIENTE FABRIL**

ALEXANDRA MARGARIDA MARQUES SIMÕES

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto  
Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba  
Doutora Maria João Ramos Fraqueza

**ORIENTADOR**

Doutora Maria João Ramos Fraqueza

2010

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

**AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR *CAMPYLOBACTER* SPP. EM PEITOS DE  
FRANGO EMBALADOS EM ATMOSFERA PROTECTORA E EM SUPERFÍCIES DO  
AMBIENTE FABRIL**

ALEXANDRA MARGARIDA MARQUES SIMÕES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

**CONSTITUIÇÃO DO JÚRI**

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto  
Doutora Maria Constança Matias Ferreira Pomba  
Doutora Maria João Ramos Fraqueza

**ORIENTADOR**

Doutora Maria João Ramos Fraqueza

2010

LISBOA

***Aos meus pais e irmão***  
***Ao Filipe***

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Maria João Fraqueza, minha Orientadora, pela simpatia e amizade demonstradas, pela sua disponibilidade e pela grande partilha de experiência e conhecimentos durante a realização deste trabalho.

À Direcção do Matadouro Industrial de Carnes em questão, na pessoa do Engenheiro Luís Rosa, que possibilitaram a recolha das amostras biológicas e disponibilizaram toda a informação necessária para a prossecução dos objectivos deste trabalho.

À Lena e Maria José, pela disponibilidade, simpatia e auxílio durante a execução do trabalho laboratorial.

À Dra. Rita Esgalhado e Dra. Inês Viegas, pela amizade, disponibilidade e apoio prestados durante a realização desta Dissertação.

Ao Dr. Vítor Marques, por todo o carinho, amizade, apoio, incentivo e motivação durante a realização deste trabalho.

A todos os que me ajudaram e acompanharam durante a elaboração do presente trabalho.

A todos um sincero  
Muito Obrigado!!!!



# **AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR *CAMPYLOBACTER* SPP. EM PEITOS DE FRANGO EMBALADOS EM ATMOSFERA PROTECTORA E EM SUPERFÍCIES DO AMBIENTE FABRIL**

## **RESUMO**

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, com repercussões significativas a nível da Saúde Pública e com elevado impacto socioeconómico. Nos últimos anos tem-se reconhecido *Campylobacter* spp. como um microrganismo emergente de origem alimentar, que se encontra amplamente distribuído no ambiente. A incidência de infecção por *Campylobacter* spp. em humanos tem vindo a aumentar significativamente nos últimos anos. Segundo o relatório da EFSA (2009b), em 2007 foram reportados pelos Estados Membros cerca de 200.507 casos confirmados de campilobacteriose no homem, no entanto em Portugal não existem dados oficiais sobre esta doença.

O presente trabalho tem como principal objectivo determinar a frequência e nível de contaminação por *Campylobacter* spp. em peito de frango e em superfícies de contacto directo e indirecto numa sala de desmancha (mesa, tapete, parede, lâmina para corte de asas e lâmina para retirar peles dos peitos) após a respectiva higienização. Recolheram-se 21 amostras de superfícies, de acordo com a ISO 18593:2004 e 21 amostras de peito de frango embaladas em atmosfera protectora em diferentes dias de trabalho, refrigeradas a 4°C durante 72 horas, para pesquisa e quantificação de *Campylobacter* spp. de acordo com as ISO 10272-1:2006 e 10272-2:2006.

Todas as amostras de peito de frango apresentaram-se contaminadas com *Campylobacter* spp. (100%), sendo a espécie predominante *Campylobacter jejuni* (47%). Nas amostras das superfícies não foi detectada a presença de *Campylobacter* spp.

O estudo demonstrou que a quantidade de bactérias presentes no peito de frango não se relacionou com a possível contaminação das superfícies da sala de desmancha, sendo provavelmente devido a contaminações cruzadas, ao longo da linha de abate, manipulação e embalamento.

**Palavras-chave:** *Campylobacter*, zoonose, contaminação, contagem, carne de frango, Portugal

# CONTAMINATION ASSESSMENT BY *CAMPYLOBACTER* SPP. IN POULTRY BREAST PACKAGED IN PROTECTIVE ATMOSPHERE AND ON SURFACES OF THE MANUFACTURING ENVIRONMENT

## ABSTRACT

Campylobacteriosis is a zoonosis that represents an important public health problem with considerable socio-economic impact in the EU. In recent years *Campylobacter* spp. has been recognized as an emerging foodborne pathogen, which is widely distributed in the environment. The incidence of infection by *Campylobacter* has been rising significantly. In 2007, according to the EFSA (2009b), 200,507 cases of campylobacteriosis in humans were reported by the Member States. In Portugal there isn't any official information available about this zoonotic disease.

The aim of this work was to evaluate the frequency and contamination level by *Campylobacter* spp. in poultry breast and on surfaces of direct and indirect contact in the processing room, after its hygiene. On different working days 21 surfaces samples were collected, according to the ISO 18593:2004 and 21 poultry breast samples packaged in protective atmosphere, and refrigerated at 4°C during 72 hours. Then, according to ISO 10272-1:2006 and ISO 10272-2:2006, analysis were done for the detection and quantification of *Campylobacter*.

All samples of poultry breast were contaminated with *Campylobacter* spp. (100%) and the *Campylobacter jejuni* was more frequently isolated species from this samples (47%). The surfaces samples weren't contaminated with this enteropathogen.

This study showed that the contamination on the poultry breast weren't related with the contamination of the surfaces. Probably this was due to cross contamination along the processing operations (scalding, defeathering, eviscerating, washing and chilling), handling and packaging

**Keywords:** *Campylobacter*, zoonosis, contamination, poultry, Portugal

## ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO.....	1
-----------------	---

## PARTE I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. SITUAÇÃO ACTUAL DE CAMPILOBACTERIOSE NA EUROPA.....	4
2. IMPORTÂNCIA DO CONSUMO DE CARNE DE AVES EM PORTUGAL.....	8
3. CARACTERIZAÇÃO DO GÉNERO <i>CAMPYLOBACTER</i> .....	11
3.1. Considerações Taxonómicas e Nomenclatura.....	11
3.2. Características Microbiológicas.....	14
3.3. Métodos para Detecção de <i>Campylobacter</i> spp. ....	17
3.3.1. Enriquecimento e Isolamento.....	17
3.3.2. Confirmação.....	19
3.3.3. Identificação.....	20
3.4. Epidemiologia.....	22
3.4.1. Incidência e Distribuição.....	22
3.4.2. Reservatórios e Fontes de Contaminação.....	25
3.4.2.1. Aves.....	25
3.4.2.2. Água.....	29
3.4.2.3. Leite.....	29
3.4.2.4. Outras espécies animais.....	30
3.4.2.5. Outros reservatórios.....	32
3.5. Patogenia.....	33
3.5.1. Manifestações Clínicas.....	39
4. INTERVENÇÕES “DO PRADO AO PRATO” PARA PREVENIR A CONTAMINAÇÃO POR <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP. ....	40

## PARTE II – TRABALHO EXPERIMENTAL

### AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR *CAMPYLOBACTER* SPP. EM PEITOS DE FRANGO EMBALADOS EM ATMOSFERA PROTECTORA E EM SUPERFÍCIES DO AMBIENTE FABRIL

1. OBJECTIVOS.....	46
--------------------	----



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Sistema de Vigilância de <i>Campylobacter</i> spp. nos 27 Países da União Europeia (Adaptado de: Takkinen, Ammon, Robstad & Breuer, 2003) .....	6
<b>Figura 2</b> – Distribuição das espécies de <i>Campylobacter</i> isoladas a partir de amostras de aves (A) e respectiva carne (B) (Adaptado de: EFSA, 2009a) .....	7
<b>Figura 3</b> – Previsão da produção de carne de aves na União Europeia, Estados Unidos, China e Brasil (Adaptado de: AVEC, 2009) .....	9
<b>Figura 4</b> – Previsão do consumo de carne de aves, na União Europeia, Estados Unidos, China e Brasil (Adaptado de: AVEC, 2009) .....	9
<b>Figura 5</b> – Evolução da produção de frango de carne em Portugal desde Setembro de 2007 a Setembro de 2009 (Fonte: INE, 2009) .....	10
<b>Figura 6</b> – Preferências de consumo de carne em Portugal (Adaptado de: Euroteste, 2008).....	11
<b>Figura 7</b> – Árvore Filogenética baseada nos genes 16S rRNA da Família <i>Campylobacteraceae</i> (Fonte: Vandamme, 2000) .....	13
<b>Figura 8</b> – Morfologia de <i>Campylobacter</i> spp. (Fonte: <a href="http://www.theepochtimes.com">http://www.theepochtimes.com</a> ) .....	14
<b>Figura 9</b> – Variação sazonal do número de casos de campilobacteriose confirmados e reportados pelos Estados Membros em 2007 (Fonte: EFSA, 2009a) .....	24
<b>Figura 10</b> – Fontes de infecção e mecanismo de patogenia de <i>Campylobacter</i> spp. (Adaptado de: Konkel, Monteville, Rivera-Amill & Joens, 2001) .....	34
<b>Figura 11</b> – Corte das asas .....	47
<b>Figura 12</b> – Corte dos peitos .....	47
<b>Figura 13</b> – Corte das pernas .....	47
<b>Figura 14</b> – Peito de frango embalado em cuvette sob atmosfera protectora .....	48

<b>Figura 15</b> – Reacções de hidrólise do hipurato positivas (A) e negativas (B) .....	53
<b>Figura 16</b> – Electroforese em gel de agarose .....	55
<b>Figura 17</b> – Contagem média de <i>Campylobacter</i> spp. (log ufc/g) em amostras de peito de frango, em diferentes dias de abate .....	58
<b>Figura 18</b> – Contagem média de <i>Campylobacter</i> spp. (log ufc/g) em amostras de peito de frango em função do produtor .....	58
<b>Figura 19</b> – Contagem média de <i>Campylobacter</i> spp. (log ufc/g) em amostras de peito de frango obtidas em diferentes tipos de filmes da embalagem .....	59
<b>Figura 20</b> – Identificação das espécies de <i>Campylobacter</i> pela técnica de PCR <i>multiplex</i> de alguns isolados das amostras de peito de frango (fotografia do gel de agarose) .....	60
<b>Figura 21</b> – Frequência das espécies identificadas por PCR <i>multiplex</i> , a partir dos isolados provenientes da pesquisa e contagem de <i>Campylobacter</i> em amostras de peitos de frango.....	61
<b>Figura 22</b> – Contagem média de <i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/g) em amostras de peito de frango recolhidas em dias de abate diferentes .....	62
<b>Figura 23</b> – Contagens médias de <i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/g) em amostras de peito de frango em função do produtor .....	62
<b>Figura 24</b> – Contagem média de <i>Enterobacteriaceae</i> (log ufc/g) em amostras de peitos de frango acondicionados em diferentes tipos de filme de embalagem .....	63

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Casos de campilobacteriose humana reportados no período de 2003-2007 e respectivas taxas de notificação (Adaptado de: EFSA, 2009a) .....	5
<b>Tabela 2</b> – Testes fenotípicos para confirmação das espécies termofílicas de <i>Campylobacter</i> (Fonte: ISO/FDIS 10272-1:2005) .....	19
<b>Tabela 3</b> – Resultados da pesquisa e contagem de <i>Campylobacter</i> spp. em amostras de peito de frango .....	57
<b>Tabela 4</b> – Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> em superfícies da sala de desmancha, recolhidas em diferentes dias de trabalho .....	64
<b>Tabela 5</b> – Contagem e pesquisa de <i>Campylobacter</i> spp. em diferentes superfícies da sala de desmancha .....	64

## INTRODUÇÃO

Os alimentos são um importante veículo de transmissão de muitos agentes patogénicos e compostos químicos tóxicos, que podem ser introduzidos em qualquer fase da cadeia alimentar, sendo assim imprescindível a inspecção e a implementação de medidas preventivas para assegurar a qualidade e a segurança alimentar (Direcção Geral de Saúde, 2004).

A carne de frango é uma importante fonte de proteína de elevada qualidade, rica em aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais, sendo consumida em larga escala em todo o mundo. Para além de ter um sabor agradável e exigir pouco tempo na sua preparação, é um alimento economicamente acessível a toda a população, uma vez que é uma das carnes mais baratas em Portugal (Sallam, 2007).

Nos últimos anos tem-se reconhecido *Campylobacter* spp. como um microrganismo emergente de origem alimentar, sendo considerado como a principal causa de gastroenterite em humanos (Uyttendaele *et al.*, 2006; Callicott *et al.*, 2008).

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, com repercussões significativas a nível da Saúde Pública e com elevado impacto socioeconómico na União Europeia (Direcção Geral de Saúde, 2004).

Segundo a EFSA (2009b), esta doença tem adquirido uma importância crescente na última década, sendo a mais frequentemente reportada pelos Estados Membros, ultrapassando a salmonelose.

As espécies de *Campylobacter* frequentemente isoladas no homem e nos animais são *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis*. (Ellis-Iversen, Pritchard, Wooldridge & Nielen, 2009).

*Campylobacter* spp. encontra-se distribuído na natureza, sendo o principal reservatório o tracto gastrointestinal das aves, mamíferos domésticos, nomeadamente bovinos, suínos, ovinos, canídeos e felinos, bem como animais selvagens. A contaminação por este agente enteropatogénico ocorre quer directamente através do contacto com animais portadores e respectivas carcaças, quer indirectamente pela ingestão de alimentos contaminados, tais como carne de aves, suínos e bovinos, leite não pasteurizado e água (EFSA, 2005).

Os principais factores de risco para esta zoonose são a manipulação e ingestão de carne de aves crua ou mal processada (Calistri e Giovannini, 2008).

Os surtos por campilobacteriose não são muito frequentes e a maioria das infecções aparecem de forma esporádica. Segundo Black, Kirk & Millard (2006), tal situação pode ser devida à sub-notificação dos casos e/ou à falta de participação dos mesmos às Autoridades de Saúde.

De acordo com os dados disponíveis da EFSA (2009a), Portugal é um dos Países da União Europeia que não procede à notificação dos casos e que não tem um sistema de vigilância



instituído para esta zoonose, não sendo assim possível uma comparação dos dados sobre *Campylobacter*.

Uma vez que não existe informação oficial em Portugal e sendo a carne de aves um dos alimentos mais consumidos pela população, considerou-se pertinente a realização do presente trabalho, cujo objectivo consiste na determinação da frequência e nível de contaminação por *Campylobacter* spp. em amostras de peito de frango embalado em atmosfera protectora, bem como em superfícies de contacto directo e indirecto da sala de desmancha, tentando estabelecer-se uma relação entre a possível contaminação das superfícies do ambiente fabril com a contaminação da carne.

Este trabalho encontra-se dividido em duas partes, sendo que na primeira é feita uma breve revisão bibliográfica, que incidiu na caracterização da situação de campilobacteriose na Europa e da importância do consumo de carne de aves em Portugal. Por fim, são abordadas as características deste agente enteropatogénico.

A segunda parte é composta por uma descrição do material e métodos utilizados na identificação e pesquisa de *Campylobacter* spp. em amostras de peito de frango e em superfícies do ambiente fabril, assim como a identificação de *Enterobacteriaceae*, que foi utilizado como um indicador de higiene do processo. Finalmente é feita a discussão dos resultados e são apresentadas as conclusões.

**PARTE I**  
**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1. SITUAÇÃO ACTUAL DE CAMPILOBACTERIOSE NA EUROPA

A campilobacteriose é uma doença emergente de origem alimentar, que representa um importante problema de saúde pública, com considerável impacto socioeconómico na União Europeia. A carne de aves é considerada o principal veículo de contaminação para o homem, estando assim associada à ocorrência de doenças gastrointestinais (Park, 2002).

O conhecimento da real incidência e/ou prevalência de casos de campilobacteriose é de extrema importância, sendo necessário uma vigilância epidemiológica rigorosa, de modo a permitir o estabelecimento de uma política integrada de segurança alimentar (Directiva 2003/99/CE).

Segundo o Relatório da European Food Safety Authority (EFSA) e do European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), as infecções por *Campylobacter*, em 2007, continuavam no topo da lista de doenças zoonóticas de origem bacteriana reportadas com maior frequência pela União Europeia, tendo ultrapassado pelo quarto ano consecutivo as infecções por *Salmonella* (EFSA, 2009b).

Em 2007, foram reportados pelos Estados Membros cerca de 200,507 casos confirmados de campilobacteriose no homem, em comparação com 175,561 casos reportados no ano anterior, tendo-se assim observado um aumento de 14,2%, isto é de 25,000 casos (Tabela 1) (EFSA, 2009b; ECDC, 2009).

No entanto, é de salientar que apesar da frequência de *Campylobacter* spp. ter aumentado, a taxa de notificação de casos na União Europeia diminuiu de 47,1% em 2006, para 45,2% em 2007. Esta diferença pode ser atribuída à entrada de dois países para a União Europeia (Bulgária e Roménia), que apesar de terem elevada densidade populacional, reportaram poucos casos de campilobacteriose (EFSA, 2009a).

Os critérios de notificação de casos de doença diferem de país para país, existindo diferenças significativas entre as incidências e/ou prevalências reportadas, não sendo assim possível fazer comparações entre os Estados Membros da União Europeia. As razões para estas sub-notificações são atribuídas às diferenças existentes nos sistemas de vigilância instituídos, isto é à falta de uma vigilância harmonizada em alguns países (Figura 1) (EFSA, 2005; Decisão da Comissão 2007/516/CE).

Apesar do exposto no artigo 3º da Directiva 2003/99/CE, que refere que a recolha, análise e publicação dos dados sobre a ocorrência de zoonoses (mais especificamente da campilobacteriose, que consta do Anexo I desta Directiva) devem ser asseguradas pelos Estados-Membros, em Portugal os relatórios oficiais não incluem esta patologia, sendo apenas reportadas as seguintes doenças bacterianas: salmonelose, shigelose e botulismo (Direcção Geral de Saúde, 2007).

Estes dados são reforçados pelo Relatório Científico da EFSA, que refere que dos 27 Estados Membros, Portugal é um dos 7 países que não faz a tipificação molecular dos

isolados de *Campylobacter* e no qual não existe um sistema de vigilância instituído, pelo que se desconhece a real situação desta doença (EFSA, 2009c).

Shane e Stern (2003) referem que a sub-notificação dos casos de campilobacteriose originam uma discrepância entre os casos diagnosticados e os não reportados, dificultando o estudo sobre a real incidência e sobre as perdas económicas que daí podem advir.

**Tabela 1** – Casos de campilobacteriose humana reportados no período de 2003-2007 e respectivas taxas de notificação (Adaptado de: EFSA, 2009a)

País	2007				2006	2005	2004	2003
	Tipo de Relatório <sup>2</sup>	Casos	Casos Confirmados	Casos Confirmados/100,000	Casos Confirmados		Casos	
Alemanha	C	66,107	66,107	80,3	52,035	62,114	55,796	47,876
Áustria	C	5,821	5,821	70,1	5,02	5,065	5,365	3,926
Bélgica	C	5,906	5,906	55,8	5,771	6,879	6,716	6,556
Bulgária <sup>3</sup>	A	38	38	0,5	0			
Chipre	C	17	17	2,2	2			
Dinamarca	C	3,868	3,868	71	3,239	3,677	3,724	3,537
Eslováquia	C	3,421	3,38	62,7	2,718	2,204	1,691	1,195
Eslovénia	C	1,127	1,127	56,1	944		1,063	890
Espanha	C	5,055	5,055	11,4	5,889	5,513	5,958	6,048
Estónia	C	114	114	8,5	124	124	124	98
Finlândia	C	4,107	4,107	77,8	3,439	4,002	3,583	3,19
França	C	3,058	3,058	4,8	2,675	2,049	2,127	1,997
Grécia	-4						392	1
Holanda	C	3,462	3,289	38,6	3,186	3,761	3,273	2,805
Hungria	C	5,856	5,809	57,7	6,807	8,288	9,087	
Inglaterra	C	57,815	57,815	95	52,134	52,686	50,388	52,126
Irlanda	C	1,891	1,885	43,7	1,81	1,801	1,71	1,568
Itália	A	676	676	1,1				1
Letónia	C	0	0	0				1
Lituânia	A	564	564	16,7	624	694	797	617
Luxemburgo	C	345	345	72,5	285	194		
Malta	C	91	91	22,3	54	91		
Polónia	C	192	192	0,5	156	47	24	
Portugal	-4							
República Checa	C	24,252	24,137	234,6	22,571	30,268	25,492	
Roménia <sup>3</sup>	-4							
Suécia	C	7,106	7,106	78	6,078	5,969	6,169	7,149
Total EU		200,889	200,507	45,2	175,561	195,426	183,479	139,581
Islândia	C	93	93	30,2	117	128		
Liechtenstein	C	14	0	0	10			
Noruega	C	2,836	2,836	60,6	2,588	2,631		
Suíça	C	6,038	6,038	79,5	5,429	5,259	5,584	5,692

**Legenda:**

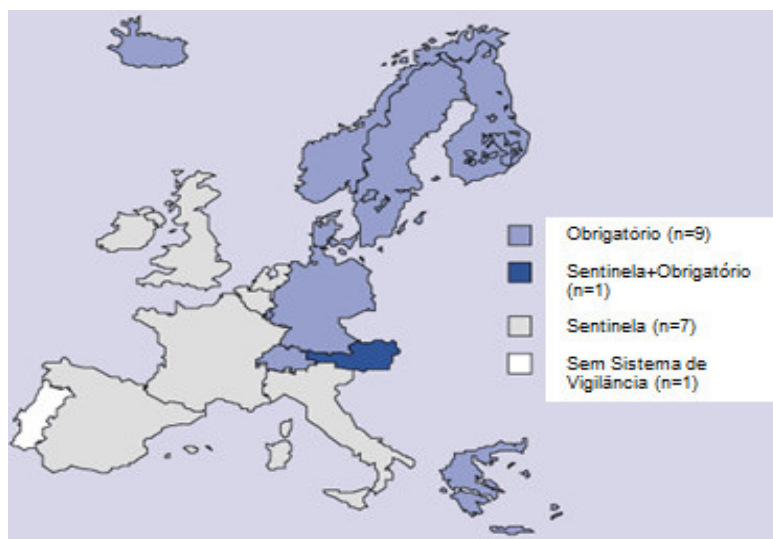
1 - Número de casos confirmados em 2005-2007 e número total de casos em 2003-2004

2 – A: Relatório de casos agregados; C: Relatório baseado em casos; -: Não existem Relatórios

3 – Membro da EU a partir de 2001

4 – Não existe Sistema de Vigilância

**Figura 1** – Sistema de Vigilância de *Campylobacter* spp. nos 27 Países da União Europeia (Adaptado de: Takkinen, Ammon, Robstad & Breuer, 2003)



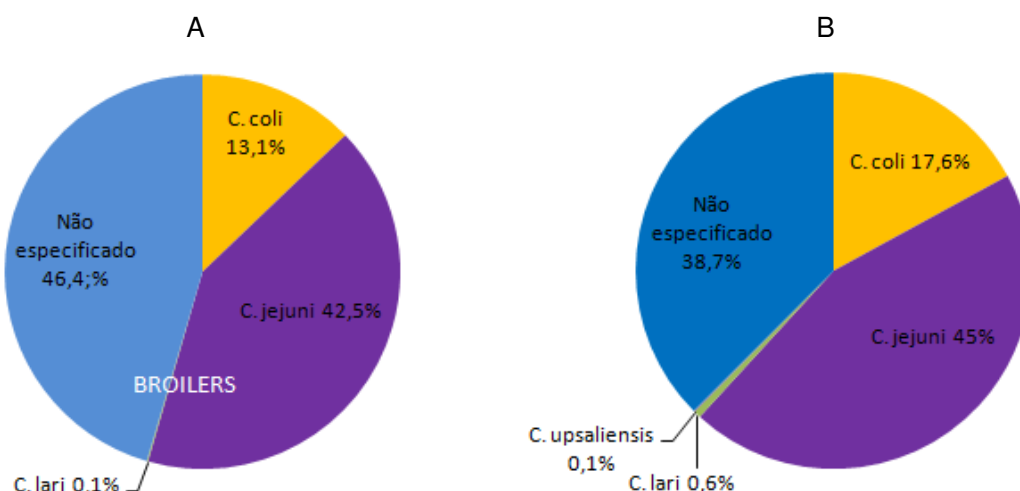
Dos relatórios apresentados pelos diferentes Estados Membros, constata-se que as espécies de *Campylobacter* que foram identificadas com maior frequência foram *Campylobacter jejuni* (44,3%), seguida de *Campylobacter coli* (2,7%) e *Campylobacter lari* (0,3%) (EFSA, 2009a).

Apesar de não existirem dados oficiais sobre *Campylobacter* spp. em Portugal, foram realizados alguns estudos no sentido de se conhecer a prevalência deste agente nos humanos. Segundo, Vicente, Barros, Florinda, Silva e Hanscheid (2008), dos 123 isolados de *Campylobacter* spp. obtidos a partir de culturas de fezes do homem, 110 foram identificados como *Campylobacter jejuni* e apenas 13 como *Campylobacter coli*.

Um outro trabalho realizado por Fernandes, Mena, Silva e Teixeira (2009), evidencia que, de um total de 112 isolados de *Campylobacter* spp. de amostras fecais humanas, 92 correspondiam a *Campylobacter jejuni* e 20 a *Campylobacter coli*.

A prevalência de *Campylobacter* na população de aves e na respectiva carne foi elevada na maioria dos países da União Europeia que reportou esta informação. Verificaram-se elevados níveis de contaminação por *Campylobacter jejuni* quer nas aves quer na carne, 42,5% e 45% respectivamente, enquanto que para *Campylobacter coli* observaram-se valores de 13,1 e 17,6% respectivamente (Figura 2). Portugal foi novamente um dos países dos Estados Membros que não reportou qualquer informação (EFSA, 2009a).

**Figura 2** – Distribuição das espécies de *Campylobacter* isoladas a partir de amostras de aves (A) e respectiva carne (B) (Adaptado de: EFSA, 2009a)



Os dados disponíveis em Portugal relativos à contaminação de aves “*in vivo*” por *Campylobacter* spp., reportam-se ao trabalho realizado por Cabrita *et al.* (1992), que teve por base a colheita de 59 amostras fecais de aves vivas, tendo obtido 79,7% das amostras contaminadas por *Campylobacter jejuni* e 20,3% por *Campylobacter coli*. Veloso (1994), no seu estudo obteve a partir de 364 amostras de carcaças de frango analisadas, uma taxa de isolamento de espécies termofílicas de *Campylobacter* de 65,6%, sendo a espécie mais frequente *Campylobacter jejuni* (57,7%), seguida por *Campylobacter coli* (42,3%). Mena, Rodrigues, Silva, Gibbs e Teixeira (2008), em 164 amostras de carne de frango, identificaram frequências de contaminação por *Campylobacter jejuni* em 68% das amostras e por *Campylobacter coli* em 32% das mesmas.

Torna-se assim necessário e urgente a implementação de sistemas de notificação para as infeções por *Campylobacter*, sendo igualmente premente ajustar o actual sistema de vigilância de acordo com as normas comunitárias. Vicente, Barros, Florinda, Silva e Hanscheid (2008) referem que dada a estrutura do sistema dos serviços de saúde em Portugal, seria importante que a responsabilidade de notificação dos casos fosse repartida pelos médicos assistentes, laboratórios, médicos veterinários e epidemiologistas.

É também importante a implementação de uma rede de vigilância harmonizada entre todos os Estados Membros, para unificação dos dados relacionados com surtos por campilobacteriose e resistências aos antibióticos identificados em cada um dos países (Takkinen *et al.*, 2003).

## **2. IMPORTÂNCIA DO CONSUMO DE CARNE DE AVES EM PORTUGAL**

A carne de aves é uma importante fonte de proteína de alto valor nutritivo com baixos níveis de gordura e rica em aminoácidos essenciais, vitaminas e sais minerais (Sallam, 2007).

Comparando a carne de aves com as carnes de animais de talho, a primeira apresenta-se mais tenra, mais succulenta, com menos gordura saturada e pigmentos, logo menos vermelha (Cepero, 2002). Nutricionalmente cem gramas de carne de frango sem pele, contém 129 kilocalorias, 25 gramas de proteínas, 1,07 gramas de gordura saturada e 1,61 gramas de ferro (Venturini, Sarcinelli & Silva, 2007).

Esta carne é consumida em larga escala por todo o mundo, uma vez que a relação qualidade/preço é bastante satisfatória para os consumidores. Para além de ser um produto relativamente barato, tem um sabor agradável e é fácil de confeccionar, exigindo pouco tempo na sua preparação (Sallam, 2007).

Em muitos países, as práticas religiosas e culturais têm uma grande influência na decisão de compra do consumidor, atendendo a esses factores os produtos à base de carne de aves não apresentam qualquer tipo de restrições, sendo a escolha de eleição (Van der Sluis, 2002; Mead, 2004).

O conceito que o consumidor tem sobre a carne de frango evoluiu muito nos últimos anos, deixando de a considerar apenas como uma fonte barata de proteína, para a ter como uma carne nutricionalmente equilibrada, mas que se pretende inócua (Temprado, 2005).

A constante exigência e procura por parte do consumidor de produtos “saudáveis”, nutritivos, frescos e “seguros”, associada a uma maior consciência do bem-estar animal e dos problemas/impactos ambientais, conduziram a uma evolução do sector avícola nas últimas décadas (Mead, 2004).

Deste modo, nos últimos 40 anos, verificou-se um crescimento dinâmico no processo de industrialização do sector avícola, acompanhado por uma evolução tecnológica, intensificação da produção e integração vertical desta produção (Barbut, 2002).

Contudo, a meta do sector avícola não deve ser apenas produzir mais, mas melhorar e assegurar a qualidade das carnes de aves. A implementação de técnicas de selecção genética, permitiu alcançar crescimentos mais eficientes e maiores rendimentos das carcaças e seus produtos, promovendo o actual estatuto de qualidade da carne nos broilers (Temprado, 2005).

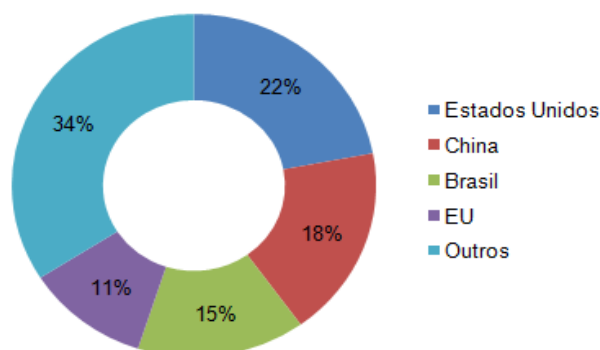
Os objectivos para aumentar a qualidade da carne de frango podem passar por melhorar os rendimentos nos matadouros, conseguir a criação de produtos diferenciados, quer geneticamente pela produção de frangos certificados e/ou biológicos, quer nutricionalmente (enriquecidos ou equilibrados) e assegurar o bem-estar dos animais e a segurança alimentar do produto final, através da implementação de medidas preventivas e verificação por análises microbiológicas (Temprado, 2005).

Segundo a Direcção Geral de Veterinária (2009), a tecnologia avícola portuguesa é uma das mais avançadas da União Europeia, a produção nacional de aves obedece às mais modernas técnicas de produção, sendo acompanhada durante toda esta fase por controlos veterinários que incidem particularmente na saúde e bem-estar dos animais.

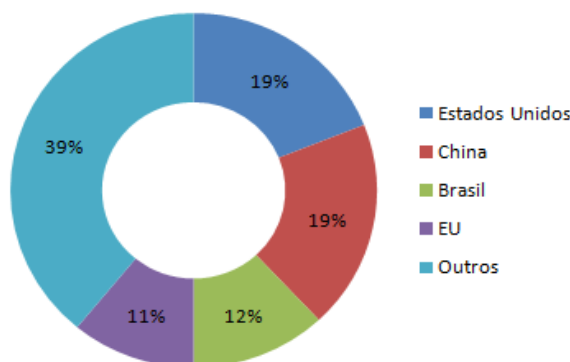
O sector de carne de aves na União Europeia é o segundo maior sector de produção de carne, logo a seguir ao dos suínos (Anónimo, 2005a).

De acordo com os dados da AVEC (Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU Countries) (2009), na última década a produção e consumo de carne de frango ganhou uma importância crescente, tendo sido registado um aumento de 66 milhões de toneladas em 1999, para aproximadamente 75 milhões de toneladas em 2009. Esta subida deveu-se principalmente aos Estados Unidos, China e Brasil, que juntamente com a União Europeia, são os maiores produtores de carne de aves, representando cerca de 66% do total da produção. Estes países são igualmente um dos maiores consumidores de carne de aves (61%) (Figura 3 e 4).

**Figura 3** – Previsão da produção de carne de aves na União Europeia, Estados Unidos, China e Brasil (Adaptado de: AVEC, 2009)



**Figura 4** – Previsão do consumo de carne de aves, na União Europeia, Estados Unidos, China e Brasil (Adaptado de: AVEC, 2009)



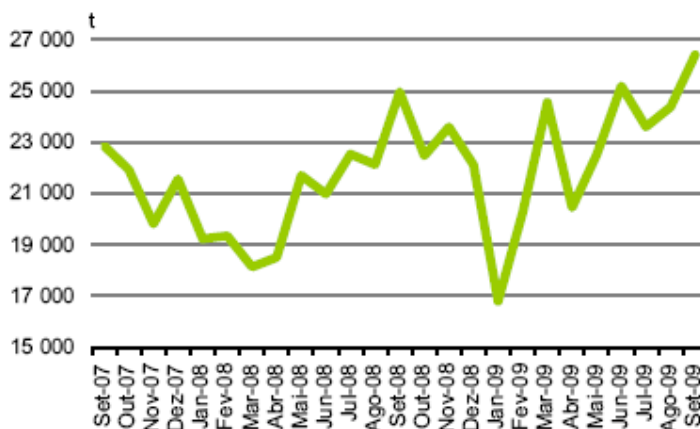


A produção de aves de capoeira em Portugal tem registado um aumento significativo nas duas últimas décadas, sendo porém de salientar uma quebra significativa ocorrida no ano 2003, devido à “crise dos nitrofuranos”, que afectou negativamente o consumo e a um verão muito quente que afectou a produção (Gabinete de Planeamento e Políticas [GPP], 2008).

Após a quebra de produção verificada em 2003 (decréscimo na produção de 12,7%), seguiu-se um aumento na produção da carne de frango de 6,8% em 2004, correspondendo a um aumento de 208 652 toneladas (no ano 2003) para 222 737 toneladas em 2004. O crescimento da produção em 2005 foi menor, sendo apenas de 1,5%, atingindo um total de 226 073 toneladas de carne de frango. Este pequeno crescimento, quase insignificativo, deveu-se à mediatização de casos de “influenza aviária” ocorridos na União Europeia e Países vizinhos (Turquia, Roménia e Croácia), afectando assim a produção nacional (GPP, 2008).

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE) (2009), a produção de frango de carne em Setembro registou um acréscimo de 5,8%, quando comparada com o ano anterior, tendo atingido uma produção de 26 412 toneladas (Figura 5). No que diz respeito ao abate de aves, também se verificou um maior volume de abate de galináceos (4,7%), dos quais 4,3% eram frangos de carne. Contrariamente a este aumento, verificou-se um menor volume de abate de perus, patos, codornizes.

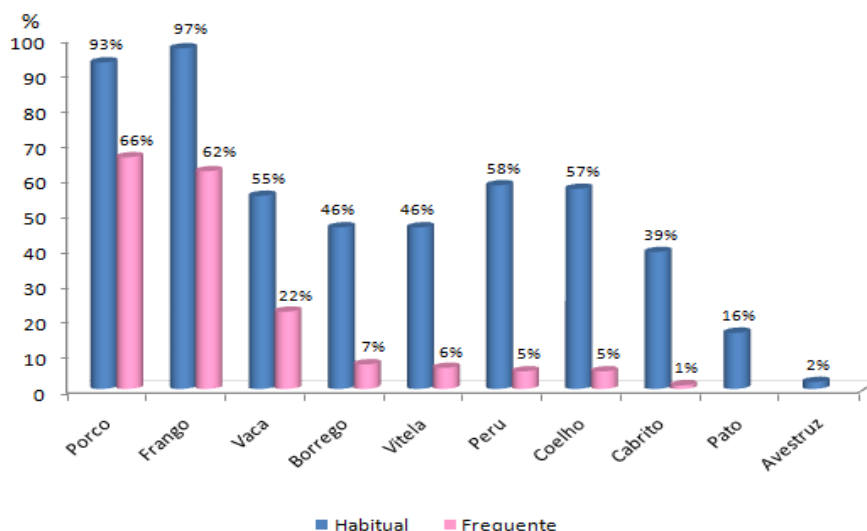
**Figura 5** – Evolução da produção de frango de carne em Portugal desde Setembro de 2007 a Setembro de 2009 (Fonte: INE, 2009)



Associado ao aumento da produção referido, também se verificou um aumento do consumo de carne de frango *per capita*, em 2008, nomeadamente de 31,5 kilogramas. De referir que, o nível de consumo da carne de aves em Portugal é o segundo mais elevado entre os países da União Europeia, encontrando-se a Irlanda em primeiro lugar com um consumo de 32,2 kilogramas *per capita* (AVEC, 2009).

Estes dados foram corroborados num estudo realizado em Portugal pelo Euroteste (2008), no qual os Portugueses foram questionados sobre o tipo de carne que consomem habitualmente. Ao comparar o consumo de carne de frango com outras carnes, constatou-se que a sua preferência vai para o primeiro tipo de carne, sendo habitualmente consumido por 97% dos indivíduos inquiridos (Figura 6).

**Figura 6** – Preferências de consumo de carne em Portugal (Adaptado de: Euroteste, 2008)



Com a mudança dos hábitos alimentares e as crescentes exigências do mercado, estima-se que em 2020, o consumo de carne de aves seja substancialmente elevado, sendo a carne mais consumida em todo o mundo (GPP, 2008; AVEC, 2009).

Assim, a previsão a médio e longo prazo para a produção de aves permanece positiva, face aos preços competitivos que apresenta em relação a outras carnes, à crescente preferência dos consumidores e ao aumento do uso/consumo de alimentos preparados à base de carne de frango, continuando a ser favorável para o crescimento deste sector (Anónimo, 2005a).

### 3. CARACTERIZAÇÃO DO GÉNERO *CAMPYLOBACTER*

#### 3.1. Considerações Taxonómicas e Nomenclatura

O género *Campylobacter* foi isolado e descrito pela primeira vez em 1913 por McFadyean e Stockman, sendo considerado como uma importante causa de infertilidade e aborto em ovinos e bovinos. Este microrganismo foi, na altura, classificado como pertencente ao género *Vibrio* e designado por *Vibrio fetus*, devido à semelhança das suas características morfológicas (Vandamme, 2000)

Nas seguintes décadas, foram realizados vários estudos e isolados microrganismos com forma espiralada em animais, que foram igualmente classificados como pertencentes ao género *Vibrio*. Em 1931, Jones *et al.* isolaram um agente bacteriano do intestino de bezerros com enterite, que designou de *Vibrio jejuni*. Mais tarde, Doyle (1944) isolou outros agentes deste grupo a partir de quadros de disenteria em suínos, denominando-os *Vibrio coli* (Vandamme, 2000; On, 2005).

As bactérias deste grupo foram descritas pela primeira vez em humanos por Levy (1948). No entanto, é de salientar o trabalho elaborado por Escherich, em 1889, onde relatou pela primeira vez a presença de “pequenos” vibrios na mucosa do intestino grosso de crianças que morreram com o diagnóstico de “*cólera infantum*”, esta foi presumivelmente provocada por *Campylobacter jejuni* ou *coli* (Wassenaar & Newell, 2006; Hansson, 2007)

Em 1957, King foi protagonista de um grande avanço a nível microbiológico, uma vez que conseguiu isolar pela primeira vez, a partir de hemoculturas de pacientes com diarreia sanguinolenta, um microrganismo morfológicamente semelhante ao género *Vibrio*, mas com diferenças antigénicas e bioquímicas, designando-o de “*Vibrio related*” (Wassenaar & Newell, 2006).

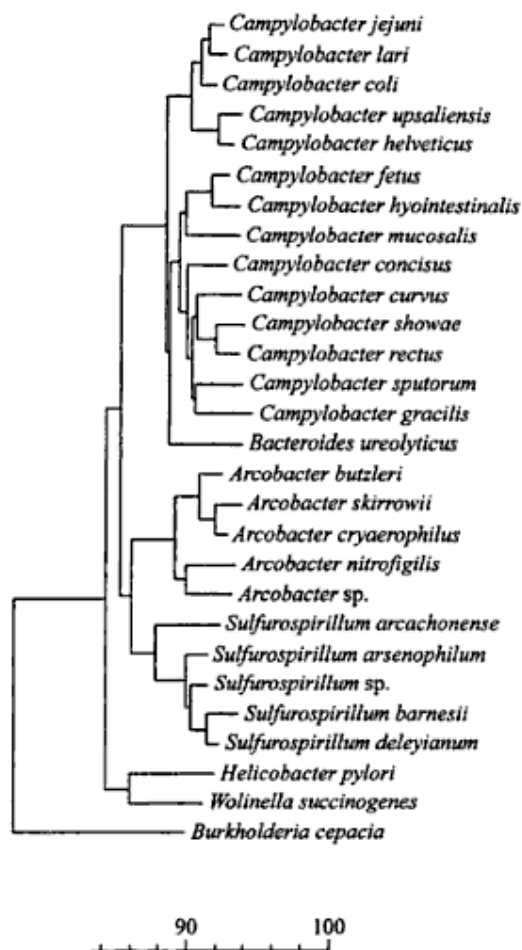
Com base em algumas provas bioquímicas, na composição do DNA e no metabolismo não fermentativo, Sebald e Véron (1963) diferenciaram as espécies *Vibrio fetus*, *Vibrio jejuni* e *Vibrio coli* e englobaram as mesmas num novo género que denominaram de *Campylobacter* (Vandamme, 2000; On, 2005). Este novo género diferenciou-se do género *Vibrio* por apresentar um baixo conteúdo das bases nitrogenadas de DNA, nomeadamente Guanina e Citosina, um carácter estritamente microaerófilico e por diferirem na forma de fermentação de carboidratos (Hu & Kopecko, 2003).

Em 1973, Véron e Chatelain publicaram um estudo taxonómico mais detalhado e consideraram 4 espécies diferentes do género *Campylobacter*, nomeadamente *Campylobacter fetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter sputorum* (que inclui a subespécie *sputorum* e a subespécie *bubulus*) (On, 2005).

Posteriormente, vários estudos foram realizados e isoladas novas espécies e subespécies do género *Campylobacter*, com base no desenvolvimento de métodos bioquímicos, serológicos e moleculares (Hansson, 2007).

Segundo vários autores, os microrganismos da família *Campylobacteriaceae* representam um grupo heterogéneo, que com base nas relações filogenéticas e na comparação das sequências genómicas 16S rRNA, compreende as bactérias dos géneros *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* e *Wolinella* formando assim um grupo que pertence à superfamília VI rRNA (Figura 7) (Vandamm, 2000; Hu & Kopecko, 2003; On, 2005).

**Figura 7** – Árvore Filogenética baseada nos genes 16S rRNA da Família *Campylobacteriaceae* (Fonte: Vandamme, 2000)



Actualmente o género *Campylobacter* pertence ao Reino das Bactérias, Filo das *Proteobacterias*, Classe das *Epsilon Proteobacteria*, Ordem *Campylobacterales*, Família *Campylobacteriaceae* (Levin, 2007).

Segundo Euzéby (2009), encontram-se descritas 29 espécies e 13 subespécies de *Campylobacter* sendo elas: *C. avium*, *C. butzleri*, *C. canadensis*, *C. cinaedi*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. cryaerophylos*, *C. cuniculorum*, *C. curvus*, *C. fennelliae*, *C. fetus* (subespécie *fetus* e subespécie *venerealis*), *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyoilei*, *C. hyointestinalis* (subespécie *hyointestinalis* e subespécie *lawsonii*), *C. insulaenigrae*, *C. jejuni* (subespécie *jejuni* e subespécie *doylei*), *C. lanienae*, *C. lari* (subespécie *concheus* e subespécie *lari*), *C. mucosalis*, *C. mustelae*, *C. nitrofigilis*, *C. peloridis*, *C. pylori* (subespécie *pylori* e subespécie *mustelae*), *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* (subespécie *bubulus*, subespécie *mucosalis* e subespécie *sputorum*) e *C. upsaliensis*.

Das espécies e subespécies identificadas, as mais importantes são as que pertencem ao grupo das termófilas, nomeadamente *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e

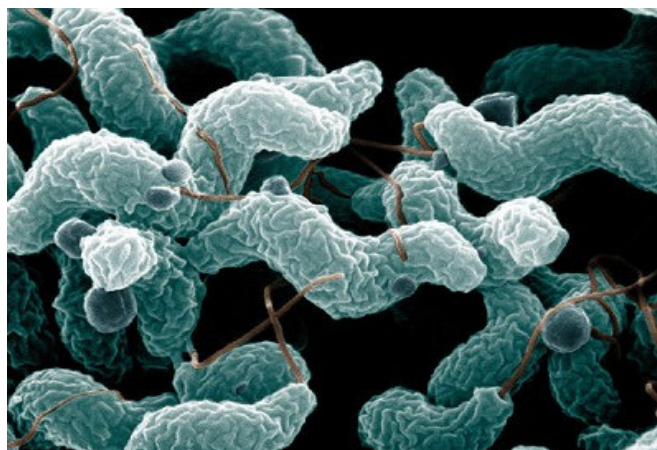
*Campylobacter lari*. De salientar que, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* constituem as espécies que são, com maior frequência, isoladas em casos de gastroenterites em humanos e animais. Algumas estirpes de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus* subespécie *venerealis* e *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* provocam infertilidade e aborto em ovelhas, sendo a última ocasionalmente isolada em humanos com septicemia. As espécies *Campylobacter concisus*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae* e *Campylobacter gracilis* foram isoladas na cavidade oral humana e *Campylobacter spoturum* foi isolada a partir do aparelho reprodutivo e gastrointestinal de animais (Klena *et al.*, 2004; Centre for Food Security & Public Health [CFSPH], 2005). Outras espécies, como *Campylobacter hyointestinalis* e *Campylobacter upsaliensis* são igualmente considerados microrganismos emergentes, com potencial para causar doença em humanos e animais, no entanto têm menor expressão clínica (Klena *et al.*, 2004; Centre for Food Security & Public Health [CFSPH], 2005).

### 3.2. Características Microbiológicas

As bactérias do género *Campylobacter* são bastonetes Gram negativos e caracterizam-se por terem uma morfologia curva típica, em forma de “S”, de vírgula ou em espiral (Figura 8). Por vezes, estes microrganismos podem ainda apresentar uma forma que se designa por “asa de gaivota”. Outras características frequentemente observadas são as longas formas espirais, que ocorrem quando duas “células filhas” permanecem juntas, após a respectiva divisão (Carvalho, Lima, Pereira & Schocken-Iturrino, 2001; Quinn, Markey, Cártter, Donnelly & Leonard, 2002).

O género *Campylobacter* apresenta as seguintes dimensões: 2 a 0,5 µm de largura e 0,5 a 8 µm de comprimento (Donnison, 2003 & Park, 2002).

**Figura 8** – Morfologia de *Campylobacter* spp. (Fonte: <http://www.theepochtimes.com>)



Estes microrganismos são móveis, devido à presença de um único flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades, que pode medir até três vezes o comprimento da célula, e que lhe confere o movimento característico tipo “saca-rolha” ou “vaivém”. De referir que, esta característica pode ser facilmente observável ao microscópio de contraste de fase ou em campo escuro (Quinn *et al.*, 2002; Levin, 2007).

Quando as condições de desenvolvimento lhe são desfavoráveis, quer por envelhecimento das culturas (culturas com mais de 48 horas) ou por stress oxidativo, pode ocorrer uma retracção citoplasmática, na qual as células transitam para uma forma cocoide (Keener, Bashor, Curtis, Sheldon & Kathariou, 2004).

Segundo o estudo elaborado por Keum-Il *et al.* (2007), as células podem igualmente transitar para esta forma, quando sujeitas a diferentes temperaturas, nomeadamente de 25°C e 4°C.

Esta característica confere à bactéria a capacidade de entrar num estado que se pode descrever como “não cultivável, mas viável”, que lhe permite sobreviver aos factores de stress ambiental e manter a sua virulência. Quando as condições do meio se tornam novamente favoráveis, é possível a reversão para a forma espiral, bem como a respectiva multiplicação (Bhavsar & Kapadnis, 2007; Keum-Il *et al.*, 2007).

*Campylobacter* spp. são microrganismos de crescimento lento mas extremamente fastidiosos, requerendo condições culturais específicas para o seu crescimento. A maioria das espécies são microaerófilas, com metabolismo respiratório complexo, necessitando de uma atmosfera com baixas concentrações de oxigénio para o seu crescimento. Contudo, algumas espécies como *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter showae* e *Campylobacter sputorum* conseguem crescer em condições de anaerobiose (Gunther & Chen 2009).

Assim, estas bactérias microaerófilas para se desenvolverem necessitam de um ambiente contendo 5% de oxigénio, 10% de dióxido de carbono e 85% de azoto. A temperatura óptima situa-se entre os 37°C e 42°C, não crescendo em ambientes com temperaturas inferiores a 30°C (Quinn *et al.*, 2002). No entanto, De Cesare *et al.* (2002), citado por Keener *et al.* (2004), constataram que o *Campylobacter jejuni* tem capacidade de sobrevivência em ambientes com temperaturas de 27°C e com 60% a 62% de humidade relativa.

De salientar que, a actividade metabólica destes microrganismos não cessa a baixas temperaturas, pois desenvolvem um mecanismo de adaptação ao ambiente. Segundo, o estudo realizado por Davis e Conner (2007), as espécies termotolerantes de *Campylobacter* apresentam actividade metabólica à temperatura de 4°C, pelo que conseguem sobreviver neste ambiente.

O pH óptimo para o desenvolvimento do género *Campylobacter* situa-se entre 5,8 e 8,0, ficando inactivos a pH inferior a 4,9 (Boxall, 2005).

Estes bastonetes Gram negativos são não formadores de esporos, não hemolíticos e índol negativos. De salientar, as propriedades de oxidase e catalase positivas, que lhe conferem a capacidade de decomposição do peróxido de hidrogénio em oxigénio e água e a capacidade de catalisarem reacções de oxidação/redução, envolvendo o oxigénio molecular como aceitador de electrões, respectivamente (Wassenaar & Newell, 2006; Levin, 2007).

*Campylobacter* spp. não fermenta nem oxida os hidratos de carbono, obtendo a sua energia a partir de aminoácidos ou de compostos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. As reacções bioquímicas típicas incluem a redução do fumarato a succinato e vermelho metilo, bem como as reacções para produção de acetoina e indol. A maioria das espécies reduz o nitrato a nitrito, com excepção do *Campylobacter jejuni* subespécie *doylei* (Vandamme, 2000).

Segundo Gunther e Chen (2009), a diferenciação das espécies pode ser feita com base na hidrólise do hipurato (*Campylobacter jejuni*) e na sensibilidade ao ácido nalidixico.

Conforme referido anteriormente, estas bactérias são muito sensíveis a alterações ambientais, afectando a sua capacidade de sobrevivência, nomeadamente ambientes secos, com elevadas concentrações de oxigénio, a condições ácidas (morrem rapidamente a pH 2,3), congelação, salinidade, radiações gama (aproximadamente 2 KiloGrey) e detergentes, tais como hipoclorito de sódio, glutaraldeído, formaldeído e etanol (Donnison, 2003; Sallam, 2006).

Esta sensibilidade ao stress ambiental parece ser confirmada pela ausência de genes análogos aos existentes em outras bactérias, que a incapacita de se adaptar fisiologicamente a ambientes adversos, por exemplo, stress oxidativo, osmoregulação e choque de calor e frio (Park, 2002).

Sendo este agente igualmente sensível aos produtos tóxicos derivados do oxigénio (tais como peróxido de hidrogénio e iões superóxido), a tolerância dos mesmos a este componente pode ser fomentada pela adição de sangue (de cavalo desfibrinado/lisado) e de substâncias redutoras como o metabissulfito de sódio, piruvato de sódio e sulfato ferroso aos meios de cultura, uma vez que estes compostos neutralizam os efeitos tóxicos supracitados (Donnison, 2003; EFSA, 2005).

A presença de microflora competitiva nas amostras em estudo pode condicionar o crescimento de *Campylobacter* spp.. Chantarapanont, Berrang e Frank (2003) com base nos resultados obtidos no seu ensaio, concluíram que os microrganismos associados aos produtos derivados de frango, tais como *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* inibem o crescimento de *Campylobacter jejuni*.

Outra característica a realçar é a capacidade de resistência do género *Campylobacter* a uma vasta gama de antibióticos, nomeadamente Vancomicina (inibidor dos cocos Gram-positivos), Polimixina B (inibidor das *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas* spp.), Trimetoprim (inibidor do *Proteus* spp. e cocos Gram-positivos) e cefalosporinas (inibidor de *Enterobacter*

*spp.*, *Serratia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, algumas espécies de *Proteus* e *Yersinia enterocolitica*) (Park, 2002; Donnison, 2003).

Mena *et al.* (2008) relatam que a resistência deste microrganismo à ampicilina, tetraciclina e eritromicina tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos, tendo-se obtido concentrações inibitórias mínimas de 128 µg/ml, 512 µg/ml e 256 µg/ml, respectivamente.

### **3.3. Métodos para Detecção de *Campylobacter* spp.**

Existe uma grande diversidade de procedimentos microbiológicos para isolamento, identificação e confirmação de espécies termofílicas de *Campylobacter*, contudo a instabilidade genómica associada a este agente, poderá dificultar a aplicação dos mesmos, tornando-os muito morosos, dispendiosos e exigentes, pelo que é fundamental a presença e/ou manutenção de condições ambientais/laboratoriais específicas, para a conservação da viabilidade deste agente (Shane & Stern, 2003 & Ridley, Allen, Sharma, Harris & Newell, 2008).

Os métodos de análise e os planos de amostragem são elementos decisivos para o isolamento e identificação de *Campylobacter* spp., sendo necessário o cumprimento de três premissas, designadamente: uso de meios selectivos, incubação em atmosfera microaerófila e manutenção da temperatura a 42°C (Kuana *et al.*, 2008).

#### **3.3.1. Enriquecimento e Isolamento**

Segundo, Corry, Atabay, Forsythe e Mansfield (2003) a análise de *Campylobacter* spp. pode ser realizada por isolamento directo e por enriquecimento seguido de sementeira em meio sólido selectivo.

Quando a amostra a analisar é susceptível de ter um elevado nível de contaminação por *Campylobacter*, por exemplo no caso de amostras de fezes, conteúdo intestinal, carne ou miudezas cruas de frango, é aconselhável a realização do isolamento directo. Contudo, se o número de bactérias presentes na amostra for baixo ou se tiver ocorrido algum dano por stress ambiental, tal como alterações na temperatura, privação de nutrientes, desidratação ou exposição a ambiente aeróbio, é necessário o uso de meios de enriquecimento, uma vez que estes melhoram a sensibilidade da cultura e aumentam a capacidade de recuperação/sobrevivência de *Campylobacter* nas amostras (World Organisation for Animal Health [OIE], 2008).



Assim sendo, é necessário o desenvolvimento de meios selectivos para o isolamento das bactérias do género *Campylobacter* consideradas de difícil crescimento e cultivo (Corry *et al.*, 2003).

A selectividade destes meios é determinada pelo uso de antibióticos, uma vez que estes permitem o crescimento das estirpes de *Campylobacter* spp. em colónias facilmente detectáveis e inibem o crescimento de bactérias de outros géneros presentes nas amostras em análise. Os antibióticos geralmente utilizados são: vancomicina, polimixina B, trimetoprim, cefoperazona, rifampicina ou colistina, no entanto, também podem ser adicionados antifúngicos, tais como ciclohexamida e anfotericina B (Line, 2001; Corry *et al.*, 2003).

Donnison (2003) reportando-se ao estudo de Martin *et al.* (2002), referiu que a ciclohexamida é considerada muito tóxica, pelo que poderá ser substituída pela anfotericina B ou natamicina.

A adição de sangue ou de carvão ao meio tem como objectivo promover a viabilidade do agente em questão, removendo os derivados tóxicos do oxigénio, que se formam quando o meio é exposto à luz (Kuana, Santos, Rodrigues & Nascimento, 2009).

Potturi-Venkata (2007) refere igualmente que, os resultados de alguns estudos demonstraram que a inoculação de placas com sangue ou carvão aumenta a taxa de recuperação desta espécie.

Na década de 70, Skirrow desenvolveu um meio de cultura que permitiu a identificação de *Campylobacter* spp. a partir de fezes. Este meio continha uma fonte de nutrientes (peptonas), sangue de cavalo lisado e antibióticos (vancomicina, polimixina B e trimetoprim) (Donnison, 2003; EFSA, 2005).

Posteriormente, foram desenvolvidos outros meios selectivos, com base no mesmo princípio, isto é na supressão da microflora competitiva, através da adição de agentes selectivos. Surgem assim, o meio CAMPY-BAP (Blaser *et al.*, 1979), meio Butzler (Butzler & Skirrow, 1979), mCCD agar (modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar) (Hutchinson & Bolton, 1984) e Preston agar (Bolton & Robertson, 1982). Sendo que este último meio tem a particularidade de permitir o isolamento de *Campylobacter* a partir de amostras ambientais e de fezes (EFSA, 2005; Kuana *et al.*, 2008).

Oyarzabal, Macklin, Barbaree e Miller (2005) salientaram que a escolha de um meio adequado é de extrema importância, uma vez que este pode afectar a taxa de recuperação da espécie em causa. Considerando a performance e custo dos meios existentes, o mCCD agar é o recomendável para o isolamento de *Campylobacter* a partir de amostras de aves (conteúdo cecal, pele de pescoço, peito).

Esta consideração vai ao encontro do estipulado na ISO 10272 – 1 (2005) e ISO 10272 – 2 (2006), que também recomenda a utilização do meio mCCD agar, para o isolamento deste agente.

Quanto aos meios de enriquecimento os mais utilizados são o caldo Bolton, caldo Preston, meio de enriquecimento de *Campylobacter* (CEB) e o caldo Park & Sanders.

Apesar da grande diversidade de meios existentes, não existe um meio específico para cada espécie de *Campylobacter*, isto é, não existe nenhum meio que permita apenas o crescimento de *Campylobacter jejuni* e iniba *Campylobacter coli*, ou vice-versa. Porém, alguns meios podem ser mais favoráveis ao desenvolvimento de algumas espécies de *Campylobacter*, devido à presença de determinados componentes, por exemplo, algumas estirpes de *Campylobacter coli* são mais sensíveis à Polimixina B, não ocorrendo a sua presença nos mesmos (Martin, Mattick, Harrison & Humprey, 2002).

### 3.3.2. Confirmação

A confirmação das espécies de *Campylobacter* é realizada com base em testes fenotípicos, nomeadamente através da observação microscópica da mobilidade e da morfologia das colónias, bem como de testes para detecção da oxidase (Tabela 2). Outros testes que poderão ser igualmente realizados consistem na observação do crescimento deste agente em ambiente aeróbio à temperatura de 41,5°C e em atmosfera microaeróbia a 25°C (ISO/FDIS 10272-1:2005).

As colónias características deste agente apresentam-se com coloração acinzentada (algumas com brilho metálico), húmidas e achatadas. Ao microscópio óptico podem ser observados bacilos curvos. Quanto ao crescimento deste agente, o mesmo é ausente nos meios microaeróbios e aeróbios à temperatura de 25°C e 41.5°C, respectivamente (ISO/FDIS 10272-1:2005).

**Tabela 2** – Testes fenotípicos para confirmação das espécies termófilicas de *Campylobacter* (Fonte: ISO/FDIS 10272-1:2005)

Teste	Resultados
Morfologia	Bacilos curvos
Mobilidade	Característica (muito móveis e do tipo “saca-rolha”)
Oxidase	Positivo
Crescimento aeróbio a 41,5°C	Negativo
Crescimento microaeróbio a 25°C	Negativo

### 3.3.3. Identificação

Para a identificação de *Campylobacter* spp. podem ser realizados testes de sensibilidade aos antibióticos, mais precisamente ao ácido nalidíxico e cefalotina, detecção da catalase, reacção de hidrólise do hipurato e do indoxil acetato (ISO/FDIS 10272-1:2005).

O teste de hidrólise do hipurato é o único teste bioquímico que diferencia *Campylobacter jejuni* das outras espécies de *Campylobacter*, uma vez que é a única que é hipurato-positiva. No entanto, podem ocorrer falsos positivos e falsos negativos, que terão de ser confirmados através de testes adicionais (Amri, Senok, Ismaeel, Al-Mahmeed & Botta, 2007).

A determinação bioquímica deste agente pode ser confirmada ou até mesmo substituída por métodos moleculares, baseados em técnicas de PCR (Reacção de Polimerização em Cadeia) (Ridley *et al.* 2008).

Estes métodos baseados na amplificação de DNA, têm sido amplamente utilizados, uma vez que são mais rápidos, sensíveis e específicos para a detecção de *Campylobacter* (Rudi *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007).

Ao comparar os métodos microbiológicos com os moleculares, Hong *et al.* (2007), observaram que o primeiro apresentava menor sensibilidade na detecção das diversas espécies de *Campylobacter*. De acordo com Wolffs, Norling, Hoorfar, Griffiths e Radstrom (2005) este facto poderá ser explicado pela fragilidade deste microrganismo, que para sobreviver necessita de condições específicas e acuidade nas técnicas de manipulação.

Esta diferença foi igualmente confirmada através do trabalho elaborado por Nakari, Puhakk e Siitonen (2008), que compararam os resultados obtidos entre o teste de hidrólise do hipurato e o PCR *multiplex*, tendo-se identificado por este último, 39% das amostras como *Campylobacter jejuni*, enquanto que no teste bioquímico apenas 11 % das amostras eram hipurato-positivas.

Segundo Botteldoorn *et al.* (2008), para otimizar os resultados obtidos através da técnica de PCR é necessário apurar a concentração da amostra (pré-enriquecimento), de modo a obter um melhor limite de detecção para a quantificação de um baixo número de células e proceder à eliminação de possíveis inibidores, tais como a presença de sangue, partículas de pele e gordura, através do processo de centrifugação, que tem como objectivo remover todos os detritos celulares.

Wassenaar (2000) referiu que a maioria das técnicas de PCR é baseada na amplificação de fragmentos de genes de flagelina ou genes ribossomais e que as mesmas variam em termos de complexidade, consoante o tipo de amostra. No entanto, independentemente do tipo de técnica é necessária a utilização de *primers* específicos e de uma polimerase termoestável, sendo a mais utilizada a *Taq polimerase*.

Os métodos de PCR que poderão ser utilizados na identificação de *Campylobacter* spp. são PCR Multiplex, Nested PCR, PCR-RFLP (Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de

Restrição), RAPD (DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente), AFLP (Polimorfismo do Tamanho de Fragmentos Amplificados) e PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (Wassenaar, 2000; Wang *et al.* 2002).

No entanto, nem todos estes métodos são específicos e sensíveis na identificação das espécies deste género, apresentando algumas desvantagens. O método Nested PCR pode produzir alguns resultados falsos positivos, devido à contaminação dos ácidos nucleicos, e requer a confirmação através do método ELISA (Enzimoimunoensaio) ou de hibridização (Lund, Nordentoft, Pedersen, Madsen, 2004).

Hannis *et al.* (2008), descrevem uma nova técnica denominada PCR-MLST (Multilocus Sequence Typing), que tem estado na vanguarda das recentes investigações sobre caracterização genética das estirpes de *Campylobacter jejuni* e de *Campylobacter coli*. Esta baseia-se na caracterização da heterogeneidade genómica em regiões altamente polimórficas de sete genes housekeeping. Ao comparar a presente técnica com o método PFGE e RFLP, concluiu-se que a primeira apresenta maior aptidão para tipificar e subtipificar o género *Campylobacter*. Existem algumas desvantagens inerentes a este método, que incluem o elevado tempo de análise, o preço por amostra e a necessidade das amostras derivarem de isolados puros.

A técnica de PCR mais frequentemente utilizada e que oferece uma alternativa eficaz aos ensaios bioquímicos convencionais é a técnica PCR multiplex, uma vez que requer menos tempo e esforço na sua realização (Wang *et al.*, 2002; Klena *et al.*, 2004; Ymazaki-Matsune *et al.*, 2007).

Esta técnica, contrariamente a outras técnicas moleculares, tais como PCR-RFLP e Nested PCR, não requer a manipulação do produto amplificado antes da electroforese em gel de agarose, o que diminui o risco de contaminação do *amplicon* e consequentemente o risco de obtenção de resultados falso positivos (Amri *et al.*, 2007).

A técnica PCR multiplex tem como vantagem permitir a amplificação e detecção de dois ou mais fragmentos de DNA de uma mesma amostra, bem como identificar simultaneamente as espécies de *Campylobacter*, através das sequências 23S rRNA e 16S rRNA, do gene *HipO* (hipuricase) e *mapA* característico de *Campylobacter jejuni*, do gene *asp* (aspartoquinase) e *ceuE* específicos de *Campylobacter coli*, do gene *glyA* (serina hidroximetiltransferase) de *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, e *Campylobacter upsaliensis*, e do gene *sapB2* (proteína de superfície) de *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* (Denis *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2004 & Persson & Olsen, 2005).

De referir que, Persson e Olsen (2005) e Potturi-Venkata *et al.* (2007) nos seus trabalhos experimentais utilizaram os genes *asp*, *HipO* e 16S rDNA, que são específicos para o reconhecimento das espécies *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* e género *Campylobacter*, respectivamente. Por outro lado, Denis *et al.* (1999), seleccionaram três genes diferentes, nomeadamente 16S rRNA (para identificação de *Campylobacter spp.*),

*mapA* (para identificação de *Campylobacter jejuni*) e *ceuE* (para identificação de *Campylobacter coli*).

Posteriormente os produtos do PCR podem ser caracterizados com base na diferença de tamanho/comprimento das sequências amplificadas através da técnica de electroforese em gel de agarose (Yamazaki-Matsune *et al.*, 2007; Denis *et al.*, 1999).

Os *amplicons* são detectados através do gel de electroforese com 1,5% de agarose e as bandas de DNA são marcadas com brometo de etídio e posteriormente observadas com um transiluminador de raios ultravioleta. Após a revelação podem-se observar os diferentes fragmentos de DNA com base no seu tamanho. A presença de dois fragmentos visíveis, significa que apenas uma espécie se encontra presente (Potturi-Venkata *et al.*, 2007; Nakari *et al.*, 2008).

É de extrema importância a identificação precisa das espécies, uma vez que poderá servir de suporte à vigilância epidemiológica e análise/avaliação do risco (Nakari, Puhakka & Siitonen, 2008).

### **3.4. Epidemiologia**

#### **3.4.1. Incidência e Distribuição**

A infecção por *Campylobacter* spp. constitui uma zoonose de distribuição mundial, com graves repercussões a nível da saúde pública e com um impacto socioeconómico significativo (Sandberg *et al.*, 2006; Wingstrand *et al.*, 2006).

Na maioria dos países industrializados, a incidência de campilobacteriose aumentou consideravelmente na última década, tendo-se tornado a causa de doença gastrointestinal mais frequentemente reportada na União Europeia (EFSA, 2005).

Das espécies de *Campylobacter* identificadas, as que estão frequentemente implicadas nos surtos de doença gastrointestinal são *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*, sendo reconhecidas como as mais importantes e com maior potencial patogénico, do ponto de vista da segurança alimentar (Horrocks, Anderson, Nisbet & Ricke, 2008; Ridley *et al.*, 2008).

Nos Estados Unidos da América estima-se que os microrganismos patogénicos de origem alimentar causem anualmente 76 milhões de doenças, sendo as causas atribuídas principalmente a alimentos de origem avícola. De salientar que 90% destes casos estão associados à espécie *Campylobacter jejuni*, sendo os restantes atribuídos a *Campylobacter coli* (Hannis *et al.*, 2008).

A infecção por *Campylobacter* spp. pode ocorrer em qualquer grupo etário, sendo que a sua taxa de incidência difere entre países industrializados e países em vias de desenvolvimento.

Nos países industrializados as classes etárias mais susceptíveis a este tipo de infecção incluem as crianças até 1 ano de idade e jovens adultos com idades compreendidas entre os 15 e 30 anos, enquanto que nos países em vias de desenvolvimento, a população alvo são as crianças com menos de 5 anos de idade, decrescendo o risco de infecção à medida que envelhecem. Este facto pode ser explicado pelo desenvolvimento de imunidade, secundária a uma elevada exposição ao microrganismo em causa, durante a sua infância. Podem igualmente ocorrer casos de doença em indivíduos imunodeprimidos, subnutridos e mulheres grávidas (Friedman, Neimann, Wegener & Tauxe, 2000; Al-Shamahy, Al-Robasi & Al-Moyed, 2007).

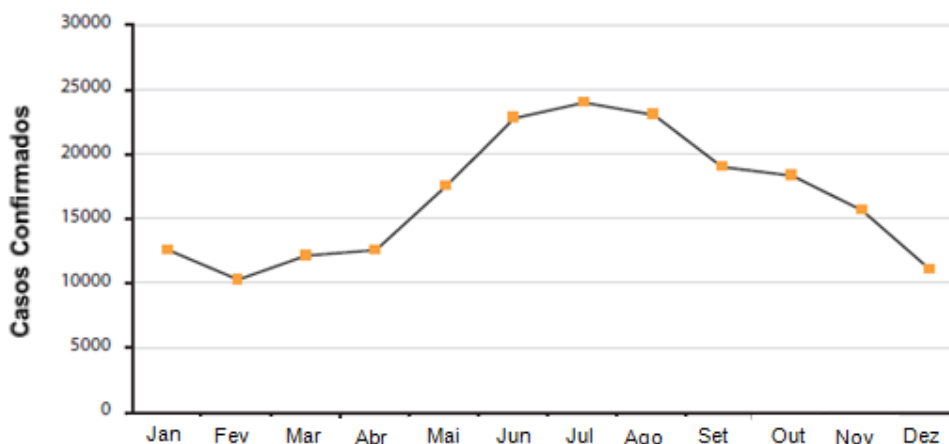
Quanto à distribuição entre sexos, Al-Shamahy *et al.* (2007) verificaram que a taxa de incidência não difere do sexo masculino para o sexo feminino, isto é, ambos os géneros são igualmente susceptíveis à infecção por *Campylobacter* spp., sendo o rácio de 1,2:1.

Por outro lado, a sazonalidade também pode afectar a incidência e/ou prevalência da campilobacteriose nos humanos, sendo que os surtos não são muito frequentes e estão associados à ingestão de água contaminada, leite não pasteurizado e alimentos prontos a comer ("ready-to-eat"), ocorrendo principalmente na Primavera e Outono. Contrariamente, os casos esporádicos constituem a maioria das infecções e surgem principalmente no Verão, sendo muitas vezes subvalorizados (Black, Kirk & Millard, 2006; Jore *et al.*, 2009).

Estes casos esporádicos são atribuídos à manipulação e ingestão de carne de aves crua ou mal processada, bem como às contaminações cruzadas que podem ocorrer durante a manipulação simultânea de carne de aves e alimentos crus, que não são sujeitos a posterior processamento e devido ao contacto das carcaças com alimentos cozinhados, mal refrigerados ou armazenados (Davis & Conner, 2006).

Segundo o Relatório da EFSA (2009a), o maior número de casos de campilobacteriose no homem foram reportados durante os meses de verão, de Junho a Agosto (Figura 9). Estas variações poderão estar relacionadas com o aumento de turistas e emigrantes nesta altura do ano, sendo que em 2006 entraram em Portugal 22,5 milhões de pessoas das quais 50% eram turistas (Vicente *et al.*, 2008).

**Figura 9** – Variação sazonal do número de casos de campilobacteriose confirmados e reportados pelos Estados Membros em 2007 (Fonte: EFSA, 2009a)



O principal factor de risco para o homem inclui a ingestão e a manipulação de carne de aves, principalmente de frango, crua ou mal processada, sendo a responsável por 50% a 70% dos casos de campilobacteriose (Corry *et al.*, 2003; Kudirkiene, Malakauskas, Sermiene & Malakauskas, 2008).

Esta contaminação por *Campylobacter* spp. pode ocorrer do “prado ao prato”, isto é ao longo de toda a cadeia alimentar, quer directamente ou indirectamente por contaminação cruzada, constituindo um grave risco para a saúde humana (Sampers *et al.*, 2008; Ellis-Iversen *et al.*, 2009).

O relatório da EFSA e do ECDC, refere que o consumo de carne de aves é considerado como uma das principais fontes de infecção no homem, tendo-se obtido, em 2007, 26% das amostras com resultado positivo. Este relatório refere ainda que este microrganismo foi encontrado noutros animais vivos, sobretudo em suínos e bovinos (EFSA, 2009b).

Sendo *Campylobacter* uma espécie termofílica, esta apresenta elevada capacidade de sobrevivência na pele do frango, acantado nos folículos das penas e nas fendas que possam ocorrer a nível da pele, justificando assim as elevadas taxas de incidência nos seus produtos e/ou nos seus derivados (Davis & Conner, 2003).

Estes dados corroboram um estudo levado a cabo na Bélgica, que revelou que a prevalência de *Campylobacter* em bandos de frangos e nas carcaças dos mesmos é bastante elevada, nomeadamente 41,1% e 45,9% (Botteldoorn *et al.*, 2008).

Segundo Stern & Pretanik (2006), a contaminação por *Campylobacter* em produtos derivados de frango pode exceder  $10^3$  UFC (Unidades Formadoras de Colónias) por 100 gramas de carne ou  $10^2$  a  $10^5$  UFC por carcaça.

No trabalho elaborado por Sallam (2007), a incidência deste agente foi igualmente elevada, tendo-se obtido nas amostras de peito, coxas e asas de frango valores de 64%, 70% e 71,1%, respectivamente. Relativamente à contagem deste microrganismo, verificou-se a

presença de 4,36 log<sub>10</sub>UFC/g nas asas, seguida de 4,18 log<sub>10</sub> e 3,92 log<sub>10</sub> UFC/g nas coxas e peito. De realçar que estes resultados foram semelhantes aos obtidos noutros estudos, designadamente de Zhao *et al.* (2001) e Meldrum, Tucker, Smith e Edwards (2005).

Apesar de todos os estudos disponíveis sobre *Campylobacter* spp., a epidemiologia deste agente é complexa e ainda não se encontra totalmente esclarecida, havendo algumas lacunas a nível do seu conhecimento. Em alguns países ainda não foi determinada a verdadeira incidência das infecções por este agente, sendo necessário clarificar a importância das diferentes fontes de infecção e o papel do hospedeiro no efeito da doença (Wingstrand *et al.*, 2006; Ridley *et al.*, 2008).

#### 3.4.2. Reservatórios e Fontes de Contaminação

*Campylobacter* spp. é considerado um microrganismo fastidioso e ubiqüitário com capacidade para sobreviver numa grande diversidade de ambientes (Keenner *et al.*, 2004; Levin, 2007).

Estes microrganismos podem ser isolados a partir de vários hospedeiros, cujo habitat natural é o tracto gastrointestinal das aves domésticas e selvagens (galinhas, perus, patos e gaivotas), bem como de outros mamíferos, nomeadamente bovinos, ovinos, suínos, equinos, canídeos e felinos. *Campylobacter* também pode estar presente no tracto gastrointestinal de animais selvagens e silvestres, na água de consumo não tratada, estuários, águas costeiras e leite não pasteurizado (Horrocks *et al.*, 2008; Olson, Ethelberg, Van Pelt & Tauxe, 2008).

##### 3.4.2.1. Aves

*Campylobacter* spp. é considerado um microrganismo comensal em muitas espécies aviárias, tais como, frangos, perus, patos e faisões (Corry *et al.*, 2003).

A colonização dos bandos de broilers geralmente ocorre nas primeiras 2 a 3 semanas de idade, em sistemas intensivos, sendo detectado entre os sete a dez dias pós-infecção. Geralmente, as aves permanecem assintomáticas até atingirem a maturidade (Newell & Wagenaar, 2000; Ridley *et al.*, 2008).

As possíveis fontes de contaminação dos bandos de aves de capoeira atribuem-se a baixos níveis de biossegurança, presença de roedores e de outros animais nas explorações, água de bebida não desinfectada, idade e tamanho do bando (Hansson, Vagsholm, Svensson & Engvall, 2007).



Os principais locais de colonização desta bactéria são o ceco, intestino grosso e cloaca das aves, onde se verifica a existência de uma elevada concentração destes microrganismos (Potturi-Venkata *et al.*, 2007).

De acordo com o estudo de Stern e Robach (2003), 94% das amostras de fezes analisadas foram positivas, sendo a média de *Campylobacter* de 5,17 log ufc/g.

A elevada temperatura metabólica (42°C) das aves, predispõe esta espécie para ser um potencial reservatório de *Campylobacter* spp., uma vez que estes crescem melhor em ambientes com temperaturas próximas de 42°C. De acordo com as necessidades específicas de crescimento deste agente, ele consegue regular a expressão dos seus genes, favorecendo a mobilidade e regulando a sua energia (Horrocks *et al.*, 2008).

As aves são uma importante fonte de contaminação, pois para além de serem um dos reservatórios deste agente, também constituem um veículo de transmissão, que não deve ser subestimado, uma vez que os seus excrementos podem contaminar pastos, forragens e águas de superfície (Kudirkienė, Malakauskas, Sermiene & Malakauskas, 2008).

As aves são coprofágicas, o que favorece a contaminação fecal-oral e promove a disseminação de *Campylobacter* por todo o bando. A rapidez com que um bando passa de um estatuto de não contaminado para contaminado, sugere que a propagação deste agente ocorre animal a animal e através da sua fonte comum de água potável (Gormley *et al.*, 2008; McDowell *et al.*, 2008).

Assim, a colonização de um bando por *Campylobacter* depende principalmente da introdução desse agente no bando. Uma vez colonizado um animal, todo o bando fica igualmente contaminado, permanecendo desta forma até ao abate. Quando um bando se torna positivo a prevalência de infecção entre as aves é elevada (Keener *et al.*, 2004).

Experimentalmente, a dose viável de *Campylobacter jejuni* necessária para colonizar os bandos é de apenas 40 ufc (unidades formadoras de colónias) (Newell & Fearnley, 2003).

A transmissão de *Campylobacter* spp. entre frangos do mesmo bando pode ocorrer de forma horizontal ou vertical (Bull *et al.*, 2006).

A transmissão horizontal é considerada como a principal causa de contaminação dos bandos e ocorre sobretudo através do contacto com água contaminada, contacto fecal, aves selvagens, roedores e tratadores. À data, os alimentos não estão implicados na disseminação deste agente, porque a ração destes animais é muito seca e não permite o seu desenvolvimento (Evans & Sayers, 2000; Line, 2001).

Segundo Newell e Fearnley (2003), a contaminação do alojamento das aves pode ser devida à presença residual destes agentes em bandos positivos anteriores ou associada à população residente de insectos/pragas e outros microrganismos. A contaminação externa ocorre quando *Campylobacter* é transportado para o interior das instalações através do pessoal responsável pelo manejo dos animais (principalmente através do uso de

equipamento contaminado), alimentos e água contaminados, e entrada de animais domésticos, selvagens e aves na exploração.

A transmissão vertical de *Campylobacter* tem sido alvo de vários estudos, pois as formas de contágio através de ovos contaminados têm sido controversas (Bull *et al.*, 2006).

Alguns estudos experimentais indicam que *Campylobacter jejuni* consegue penetrar no ovo, através da colonização do oviducto, ou por contaminação fecal da casca, contudo a sua transmissão aos pintos é improvável, uma vez que este agente é sensível ao oxigénio atmosférico e aos constituintes da clara do ovo (albumina e conalbumina), não sendo assim capaz de sobreviver nestes ambientes (Newel & Fearnley, 2003, Horrocks *et al.*, 2008).

O abate de animais infectados contribui para a contaminação de toda a linha de abate e de todas as carcaças, inclusive as provenientes de animais não infectados (Stern & Robach, 2003).

Deste modo, o transporte para as unidades de transformação, bem como as etapas de escaldão, depena, evisceração e arrefecimento favorecem a contaminação por *Campylobacter* spp. (Stern *et al.*, 2001; Posch *et al.*, 2006).

O transporte das aves para o matadouro aumenta o stress das mesmas, diminuindo a sua resistência e tornando-as mais susceptíveis às infecções. Foi referenciado por Slader *et al.* (2002) e Hansson *et al.* (2005) que a infecção por *Campylobacter* aumenta durante o transporte para o matadouro, uma vez que os animais defecam durante o mesmo, contaminando as suas penas e pele, bem como as jaulas.

Keener *et al.* (2004), referem que as penas podem apresentar um teor de *Campylobacter* de  $8 \log_{10}$  bactérias/grama e a pele pode apresentar  $6 \log_{10}$  bactérias/cm<sup>2</sup>.

O escaldão, a depenadora e a água de arrefecimento são as principais etapas responsáveis pela contaminação cruzada das carcaças de frango, uma vez que uma lavagem deficiente deste equipamento, promove a infecção das carcaças seguintes (Stern & Robach, 2003).

A temperatura do escaldão não é suficiente para eliminar por completo este agente da água, num estudo realizado por Berrang & Dickens (2000), verificou-se que antes do escaldão as carcaças apresentavam uma contaminação de  $4,73 \log_{10}$  bactérias/grama, enquanto que após esta etapa as contagens desceram para  $1,80 \log_{10}$  bactérias/grama. A permanência de *Campylobacter* após esta etapa pode ser justificada pelo facto dos folículos das penas permanecerem abertos, possibilitando a entrada deste agente. Após a depena, estes autores verificaram um aumento do nível de contaminação das carcaças ( $3,70 \log_{10}$  bactérias/grama), atribuindo este resultado às dedeiras mecânicas das depenadoras.

Os elevados níveis de *Campylobacter* frequentemente encontrados a nível da pele, podem ser devido ao processo de evisceração, ocorrendo contaminação pelo conteúdo estomacal e intestinal. Porém, também é passível de ocorrer contaminação do músculo, principalmente após a etapa de desmancha (Scherer, Bartlet, Sommerfeld & Hildebrandt, 2006; Humphrey, O'Brien & Madsen, 2007).

No trabalho realizado por Scherer *et al.* (2006), observou-se que cerca de metade das amostras de frango já desmanchadas se encontravam contaminadas a nível da pele, enquanto que menos de 1% das amostras de músculo eram positivas e 27% das amostras apresentavam contaminação simultânea do músculo e da pele.

De referir que, mais de 50% das carcaças de frango a nível do matadouro encontram-se contaminadas por *Campylobacter jejuni*, o que não é de estranhar, se tivermos em consideração que a concentração deste agente no tracto gastrointestinal é de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g (Wingstrand *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2008)

Para além da contaminação através do contacto directo, a contaminação cruzada através do ar (aerossóis) também foi relatada por vários investigadores, tendo sido inclusivamente demonstrada por Oosterom *et al.* (1983), Berndtson *et al.* (1996) e White *et al.* (2001) a existência de espécies de *Campylobacter* no ambiente fabril, no entanto a informação disponível ainda é muito limitada (Posch *et al.*, 2006).

Segundo Adkin, Harnett, Jordan, Newell e Davison (2006), a transmissão deste agente de aves infectadas e respectivas carcaças (através da manipulação e ingestão de carne crua e mal processada) para o homem é extremamente relevante, sendo que o risco aumenta à medida que o contacto e o consumo com estes são maiores.

Wingstrand *et al.* (2006), referem no seu estudo que o principal factor de risco consiste na ingestão de frango fresco, uma vez que no frango congelado o número de células viáveis de *Campylobacter* spp. diminuiu substancialmente.

Após a congelação de carcaças de frango verificou-se uma diminuição da contaminação de aproximadamente 2 log. Numa amostra de 5 lotes de frango congelados durante 31 dias, constatou-se que os níveis de contaminação das carcaças por *Campylobacter* eram reduzidos, obtendo-se valores médios compreendidos entre 0,65 log ufc/g e 2,87 log ufc/g (Stern *et al.*, 2007).

A introdução de carne de frango fresca no mercado da Islândia na década de 90, resultou num aumento da incidência da campilobacteriose humana. Após a implementação de medidas estratégicas de controlo durante o ano de 2000, que incluíram a monitorização dos bandos e congelação de carcaças de frango, verificou-se uma diminuição da incidência anual de 116 para 33 casos/100.000 pessoas. Estes resultados revelaram uma eficácia do programa de aproximadamente 70% (EFSA, 2005).

Um estudo caso-controlo na Dinamarca indicou que 50% dos casos positivos observados, 5 a 8% dos mesmos eram atribuídos à carne de frango mal cozinhada, 15 a 20% carne de frango, vaca e porco grelhada, 15 a 20% a viagens e 5 a 8% à água de bebida (Neimann, Engberg, Molbak & Wegener, 2003).

De salientar que, a contaminação das carcaças depende de diversas variáveis, nomeadamente da idade, do nível de contaminação dos lotes e da influência de factores relacionados com a produção, transporte e processamento. A determinação do nível de

contaminação nestes produtos tem implicações na saúde pública, sendo fundamental a existência de uma rastreabilidade nas aves vivas, nas carcaças de frango e nos seus produtos (Kuana *et al.*, 2008).

#### 3.4.2.2. Água

A água é uma importante fonte de surtos de campilobacteriose, sendo *Campylobacter jejuni* a espécie mais frequentemente isolada. Na sua grande maioria, estes casos são atribuídos ao consumo de água não tratada ou não desinfetada, uma vez que à data não foram reportados casos com origem no consumo de água engarrafada (Evans *et al.*, 2003).

Este agente encontra-se à superfície das águas, tendo sido isolado a partir de cursos de água naturais, águas subterrâneas, água da torneira e de poços (EFSA, 2005).

O estabelecimento da relação epidemiológica entre o agente e a fonte de contaminação consiste no isolamento de estirpes ou serotipos semelhantes quer na fonte de água em questão quer no indivíduo ou animal infectado (Kapperud *et al.*, 2003).

A contaminação dos recursos de água pode ser uma consequência da excreção de fezes de bandos de aves para os mesmos. Em alguns trabalhos, as estirpes de *Campylobacter* isoladas nas águas eram fenotipicamente e genotipicamente semelhantes às isoladas de amostras de fezes de bandos de aves de uma determinada exploração. Mas também pode ser devida à contaminação fecal por animais domésticos e selvagens, efluentes urbanos, de matadouros e de explorações (Newell & Fearnley, 2003).

Este agente consegue sobreviver na água por longos períodos, à temperatura de 4°C, por exemplo uma amostra de água da torneira foi mantida a esta temperatura, tendo-se verificado a persistência de *Campylobacter* durante 700 horas (Cools *et al.*, 2003). No entanto, segundo Newell & Fearnley (2003) as condições ambientais associadas às fontes de água naturais, como elevada concentração de oxigénio, radiação ultravioleta, privação de nutrientes e co-habitação com outros microrganismos, diminuem a viabilidade de *Campylobacter*.

Apesar da necessidade de estabelecer novas pesquisas para a compreensão do mecanismo de contaminação das águas, não há dúvidas que estas representam um risco para a saúde pública, sendo necessário proceder ao controlo deste agente através do tratamento e desinfecção das águas (Newell & Fearnley, 2003).

#### 3.4.2.3 Leite

O consumo de leite não pasteurizado/cru é frequentemente associado a surtos de campilobacteriose no homem.

*Campylobacter* foi isolado a partir de fezes de vacas leiteiras e bezerros, espécies que constituem a maior fonte de contaminação para o leite. De um total de 78 vacas leiteiras examinadas, 50 excretavam *Campylobacter* através das fezes (Stanley & Jones, 2003).

Como *Campylobacter* spp. é normalmente excretado nas fezes dos bovinos, a contaminação do leite durante ou após a ordenha é de origem fecal. Outra fonte de infecção poderá estar relacionada com contaminações cruzadas na sala de ordenha, devido à má desinfecção das tetinas e do úbere (Petersen, 2003).

Outros casos de Campilobacteriose associados à ingestão de leite de cabra, foram igualmente reportados, tendo sido isolado *Campylobacter coli* de uma criança com diarreia persistente, que ingeriu leite não pasteurizado desta espécie animal (EFSA, 2005).

A concentração de *Campylobacter* no leite não pasteurizado/cru é baixa, mas suficiente para provocar sintomatologia clínica no homem. A única forma de eliminação eficaz deste agente consiste no processamento térmico do leite, nomeadamente pasteurização e esterilização (Studahl & Andersson, 2000).

De acordo com o estudo realizado na Irlanda por Whyte *et al.* (2004), das 62 cisternas de leite analisadas, apenas uma era positiva, tendo sido isolada a espécie *Campylobacter coli*. Este resultado é explicado pelos autores, pela obrigatoriedade de pasteurização do leite na Irlanda. Não obstante, nas zonas rurais o leite não pasteurizado ser frequentemente ingerido pela população, constituindo um potencial risco para a saúde pública.

#### 3.4.2.4. Outras espécies animais

Segundo Stanley e Jones (2003), *Campylobacter* spp. são frequentemente encontradas nas fezes de animais de produção, tais como bovinos, ovinos e suínos.

Nos bovinos e ovinos, a espécie que é isolada com maior frequência é *Campylobacter jejuni*, enquanto que nos suínos é *Campylobacter coli*. A contaminação em equinos e ovinos é mais rara (Guévremont, Higgins & Quessy, 2004).

Alguns estudos, nos quais foram examinadas a prevalência e contaminação de *Campylobacter* spp. ao longo do aparelho gastrointestinal, revelaram que este agente existe em menor concentração no rúmen em relação ao intestino grosso (Horrocks *et al.*, 2008).

A prevalência da excreção fecal deste agente pode variar de acordo com a sazonalidade e a idade do animal, sendo maior nos animais jovens e persistindo para a idade adulta. De salientar que, esta prevalência é superior nos animais estabulados, em relação aos animais criados em pastagens (Beach, Murano & Acuff, 2002).

Beach *et al.* (2002) e Bailey *et al.* (2003), reportaram nos seus estudos que a incidência de *Campylobacter* é maior nos concentrados que nas forragens, devendo tal facto ser justificado pelo aumento da densidade animal, pontos de alimentação comuns (todos os

animais partilharem a mesma comida e água) e contacto físico constante com fezes de outros animais durante o confinamento.

A presença de *Campylobacter* nos bovinos contribui para a ocorrência de surtos no homem, através do contacto directo com os mesmos, contaminação ambiental e ingestão de leite (Ellis-Iversen, Pritchard, Wooldridge & Nielsen, 2009).

Normalmente, estes animais não apresentam sintomatologia, sendo portadores assintomáticos. A excreção de grandes quantidades de matéria fecal durante a pastagem, provoca a contaminação do solo e dos recursos de água, sendo esta espécie caracterizada como um potencial factor de risco (Kemp *et al.*, 2005; Heuvelink *et al.*, 2007).

A prevalência de *Campylobacter* spp. em ovinos ainda não foi completamente estudada, no entanto a espécie *Campylobacter fetus* subespécie *fetus* foi identificada como sendo a causa de aborto em ovelhas (Fenwick *et al.*, 2000). Segundo estes autores, a contaminação inicial dos borregos pode ocorrer por transmissão vertical.

Nos suínos a espécie de *Campylobacter* com maior prevalência é o *Campylobacter coli*, recuperado de amostras fecais destes animais numa taxa superior a 99% (Thakur & Gebreyes, 2005). Jensen, Dalsgaard, Baggesen e Nielsen (2006), referem que apesar desta espécie ser a predominante, os suínos também podem estar colonizados com *Campylobacter jejuni*, apresentando elevadas taxas de prevalência em amostras do conteúdo cecal ou rectal de porcas e leitões desmamados.

O mecanismo de transmissão primária de *Campylobacter* spp. entre os suínos ainda não se encontra totalmente esclarecida, mas pensa-se que ocorre a partir de outras espécies de animais que entram na exploração. Foram examinados os alimentos e as fontes de água de algumas explorações, tendo-se verificado a presença de quantidades praticamente indetectáveis de *Campylobacter* spp. (apenas 1 em 97 explorações apresentou positividade para *Campylobacter coli*, nestes produtos) (Alter *et al.*, 2005).

No matadouro, o contacto das carcaças com o equipamento das diferentes etapas de processamento, promovem a contaminação por *Campylobacter* spp. Num estudo realizado por Pearce *et al.* (2003), no qual comparou a prevalência deste agente em amostras de carcaças, cólon e recto de suínos ao longo da linha de abate, detectou-se a presença de *Campylobacter coli* em 151 amostras de um total de 202 amostras, enquanto que apenas 1% das amostras se apresentavam contaminadas com *Campylobacter jejuni*.

Os animais de companhia, mais especificamente cães e gatos, são igualmente reservatórios desta bactéria, sendo a espécie mais isolada *Campylobacter upsaliensis*, seguida por *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter helveticus* (Guévremont *et al.*, 2004).

Hald, Pedersen, Wain, Jorgensen & Madsen (2004), referem que as espécies mais prevalentes em cães e gatos são *Campylobacter upsaliensis* e *Campylobacter helveticus*,

respectivamente. Contudo, *Campylobacter jejuni*, também foi isolado destas espécies, sendo a sua maior prevalência reportada em cães com menos de 1 ano de idade.

Os animais domésticos são portadores de *Campylobacter* spp. no tracto gastrointestinal, apresentando incidências que variam de 11% a 92%, em amostras de fezes (Damborg, Olsen, Nielson & Guardabassi, 2004).

*Campylobacter* spp. tem sido isolado de cães com sintomatologia gastrointestinal (diarreia) e de cães saudáveis, sendo os responsáveis pela transmissão deste agente ao homem (Moser, Riexneuwahner, Lentzsch, Schwerk & Wieler, 2001).

A ocorrência de *Campylobacter* nestes animais constitui um grave risco para a saúde pública, uma vez que são considerados os melhores e mais próximos companheiros do homem. As elevadas frequências e taxas de isolamento de *Campylobacter jejuni* nos cães e gatos, principalmente nos animais jovens, cujo sistema imunitário se encontra pouco desenvolvido, podem ser um potencial risco para a promoção de contaminações cruzadas em canis e gatis (Damborg *et al.*, 2004).

#### 3.4.2.5. Outros reservatórios

De acordo com Shane e Stern (2003), *Campylobacter* spp. pode estar presente noutras espécies animais, tais como murideos e insectos.

*Campylobacter jejuni* já foi isolado nas fezes de murideos que co-habitam as explorações aviárias. Alguns estudos de caracterização genética sugerem que estes animais são contaminados com as mesmas estirpes das aves. A presença de murideos podem conduzir a um aumento do risco de contaminação dos bandos, contudo haverá uma redução significativa nas explorações que têm um programa de controlo efectivo desta praga (Hiett *et al.*, 2002).

As espécies de insectos mais reportadas são o escaravelho *Alphitobius diaperinus*, a mosca doméstica *Musca domestica* e a barata *Periplaneta americana* e *Blatta orientalis* (Shane & Stern, 2003; Newell & Fearnley, 2003).

*Campylobacter* apenas consegue sobreviver durante alguns dias nestes insectos. A presença dos mesmos nas explorações está associada a um maior risco de colonização dos bandos, todavia, representam um baixo potencial de infecção (Newell & Fearnley, 2003).

A contaminação de alimentos prontos a consumir por *Campylobacter* spp. deve ser considerada, resultando de contaminações cruzadas durante a sua preparação, por exemplo através de carne de frango crua, má higiene dos manipuladores, principalmente não lavagem das mãos, e má higiene das superfícies de trabalho (Whyte *et al.*, 2004).

Meldrum e Ribeiro (2003) referem que há um maior risco de contaminação destes produtos nas cozinhas domésticas em relação às cozinhas industriais, uma vez que na primeira é mais provável ocorrerem contaminações cruzadas através de utensílios, principalmente

facas, superfícies e equipamentos. O modo de conservação e reutilização de produtos previamente cozinhados e a permanência de animais domésticos nos locais onde os alimentos são preparados e armazenados, também constituem potenciais fontes de infecção.

Segundo a EFSA (2005), os casos de campilobacteriose associados ao consumo de alimentos prontos a comer são ocasionalmente reportados, pelo que não constituem uma fonte relevante de infecção humana.

Moore *et al.* (2002), estudou a prevalência de *Campylobacter* spp. nestes alimentos e os resultados das amostras destes produtos revelaram-se negativos. De referir que, estes resultados foram coincidentes com os obtidos no trabalho realizado por Meldrum e Ribeiro (2003).

Os moluscos bivalves representam uma potencial fonte de infecção para o homem, devido à contaminação das águas marinhas por *Campylobacter* spp. (EFSA, 2005).

Alguns casos de campilobacteriose reportados foram associados ao consumo de ostras e mexilhões, sendo o teor de *Campylobacter* de 25-27% e 65-69%, respectivamente. De salientar que, estes alimentos são contaminados logo após a apanha e posteriormente na etapa de depuração (EFSA, 2005).

### 3.5. Patogenia

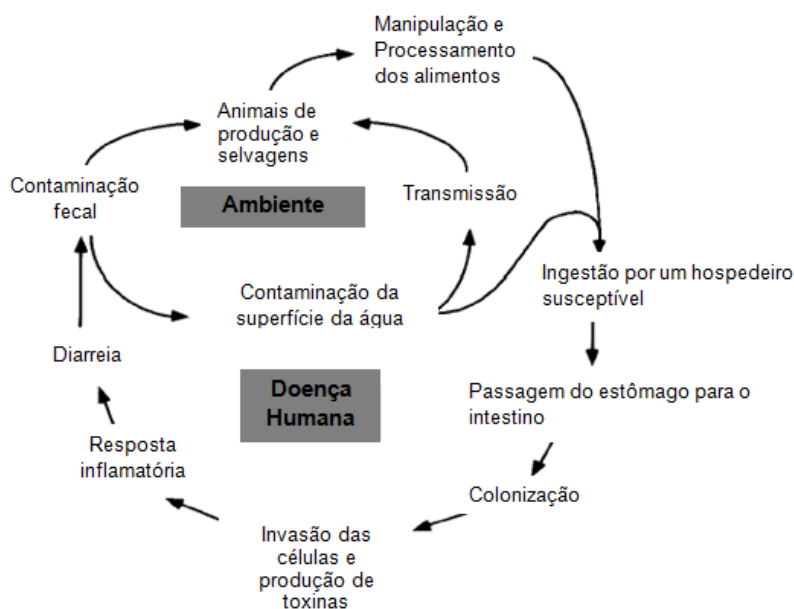
*Campylobacter* spp. é o responsável por uma grande variedade de doenças gastrointestinais em animais e no homem (Friis *et al.*, 2005).

A maioria dos animais, principalmente as aves são portadores assintomáticos, não manifestando qualquer sintomatologia clínica, no entanto constituem uma importante fonte de infecção para os outros animais e para o homem (Whyte *et al.*, 2004).

A contaminação dos humanos por este agente ocorre principalmente por via oral através da ingestão de alimentos contaminados. A maioria destas Bactérias é inactivada pelo ácido gástrico do estômago, no entanto algumas sobrevivem e aderem às células epiteliais do intestino, replicando-se (Figura 10). Os indivíduos infectados podem manifestar doença gastrointestinal, com quadro diarreico, ou permanecer como portadores assintomáticos (Janssen *et al.*, 2008).



**Figura 10** – Fontes de infecção e mecanismo de patogenia de *Campylobacter* spp. (Adaptado de: Konkel, Monteville, Rivera-Amill & Joens, 2001)



*Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são as espécies isoladas com maior frequência em casos de enterocolites em humanos, perfazendo um total de 95% das infecções nos mesmos, no entanto a espécie com maior prevalência é *Campylobacter jejuni* (Oliveira, Barbut & Griffiths, 2005; Snelling, Matsuda, Moore & Doodley, 2005).

A dose infectante de *Campylobacter* spp. é muito baixa, isto é a quantidade de agente necessária para causar doença é mínima, pelo que mesmo quando presente em baixos níveis nos alimentos, este agente representa um potencial perigo para a saúde (Mena *et al.*, 2008).

A presença de apenas 400 ou 500 microrganismos é suficiente para causar doença (Keener *et al.*, 2004; Sallam, 2007). Segundo Janssen *et al.* (2008) a dose infectante é 500 a 800 microrganismos.

Estas variações na dose infectante não dependem só da virulência do agente infectante mas também da fonte/reservatório de infecção e de outros factores, que podem determinar a susceptibilidade do hospedeiro para a infecção, não havendo assim um valor absoluto para expressar a dose mínima necessária para desencadear a infecção (Teunis & Havelaar, 2000).

Apesar dos mecanismos de patogenicidade ainda não se encontrarem completamente esclarecidos, pensa-se que os potenciais factores de virulência deste agente são a mobilidade, quimiotaxia, adesão, invasão e produção de toxinas (enterotoxinas e citotoxinas) (Snelling *et al.*, 2005; Bhavsar & Kapadnis, 2007).

Assim, a identificação e caracterização dos factores de virulência têm sido alvo de variadas investigações. O conhecimento da natureza, regulação e mecanismos de acção dos factores

de virulência é indispensável para a prevenção e tratamento das infecções (Bhavsar & Kapadnis, 2007).

### **Mobilidade**

A mobilidade é uma das etapas mais importantes no mecanismo de patogenicidade de *Campylobacter* spp. O processo de colonização está intimamente relacionado com a presença de flagelos polares, que através dos seus movimentos em ziguezague conseguem invadir e colonizar a camada mucosa do intestino (Hu & Kopecko, 2001; Konkel *et al.*, 2001). De salientar que alguns estudos, realizados na década de 80, demonstraram que a presença de flagelos desempenham um papel fundamental na patogénese desta infecção, uma vez que ao comparar estirpes flageladas com estirpes não flageladas, verificou-se que as primeiras apresentam maior capacidade de colonização da mucosa intestinal (Wassenaar, 1997).

*Campylobacter* adere às células epiteliais através da flagelina, componente filamentar dos flagelos (Bhavsar e Kapadnis, 2007).

O flagelo é constituído por um corpo basal, “gancho” e filamento. O filamento flagelar tem duas proteínas denominadas flagelina A (*flaA*) e flagelina B (*flaB*), que são sintetizadas simultaneamente, contudo a primeira é regulada por  $\sigma_{28}$  e produzida em maiores quantidades, enquanto que a *flaB*, é regulada por  $\sigma_{54}$  e é a responsável pela mobilidade (Konkel *et al.*, 2001 & Gondo *et al.*, 2006).

Para além dos flagelos existem outros factores envolvidos na colonização do tracto gastrointestinal, nomeadamente a *CadF*, uma proteína da membrana externa que facilita a ligação de *Campylobacter* a glicoproteínas e fibronectinas da membrana das células epiteliais intestinais (Monteville & Konkel, 2002).

### **Quimiotaxia**

A quimiotaxia consiste num movimento de aproximação ou afastamento de *Campylobacter* em relação a um estímulo químico, sendo um importante determinante na virulência deste agente (Konkel *et al.*, 2001).

Segundo estes autores, *Campylobacter* apresenta uma forte resposta quimiotáctica ao carboidrato L-fucose, constituinte principal da mucina (glicoproteína de alto peso molecular, secretada pelo tracto gastrointestinal).

Outros factores que também exibem uma resposta quimiotáctica positiva, mas mais fraca são os aminoácidos L-aspartate, L-cisteína, L-glutamato e L-serina, bem como os ácidos orgânicos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (piruvato, succinato, fumarato, citrato, malato e  $\alpha$ -cetoglutarato) e a bÍlis (Konkel *et al.*, 2001; Bhavsar & Kapadnis, 2007).

De realçar, a importância do processo de quimiotaxia na colonização de outros agentes patogénicos como *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (Konkel *et al.*, 2001).

### **Adesão**

A etapa de adesão do *Campylobacter* às células epiteliais do intestino é assegurada pela presença de adesinas, localizadas nos flagelos e noutros componentes da superfície celular bacteriana, tais como os lipopolissacáridos (LPS) (Levin, 2007).

O LPS é um dos principais componentes da membrana exterior de bactérias Gram-negativas, tem propriedades endotóxicas, está envolvido na adesão às células e pensa-se que também poderá intervir na variação antigénica (Bhavsar & Kapadnis, 2007).

O LPS é constituído por três componentes estruturais distintos, designadamente o lípido A, que se encontra ancorado à membrana exterior e corresponde à parte endotóxica desta, uma região central “core” (oligossacárido), e o Antígeno O, que é composto por unidades repetidas de polissacáridos ligados covalentemente ao “core” (Fry *et al.*, 2000).

No “core” das estirpes de *Campylobacter jejuni* foi detectada a presença de ácido N-acetil-neurâmico (ácido siálico), que quando ligado por ligações do tipo 2-3 a  $\beta$ -D galactosidase, assemelha-se à estrutura dos gangliósidos. Este mimetismo molecular poderá estar na origem das doenças auto-imunes, como o Síndrome de Guillain-Barré, conduzindo à desmielinização e/ou degeneração axonal dos nervos periféricos (Levin, 2007).

Segundo Konkel *et al.* (2001), o LPS de *Campylobacter jejuni* é similar ao do *Haemophilus* spp. e *Neisseria* spp. No entanto, o LPS característico de *Campylobacter* spp. é caracterizado por apresentar baixo peso molecular e carecer de cadeias de polissacárido O (designando-se por lipooligossacárideo).

Foram desenvolvidos vários trabalhos para tentar determinar os mecanismos de síntese das moléculas de LPS. Fry *et al.* (2001), clonaram o gene “cluster” (*wla*), que se encontra envolvido na síntese das moléculas de LPS e demonstraram que este gene codifica a UDP-glucose-4-epimerase. Esta por sua vez é codificada pelo gene “*galE*”, catalisando a conversão da UDP-galactose e UDP-glucose. A UDP-galactose é utilizada na síntese dos polímeros de carboidratos, incluindo os factores de virulência bacterianos e exopolissacáridos. Ao eliminar uma parte do gene “*galE*”, verificou-se a ausência de galactose na região “core” do LPS, diminuindo a sua capacidade de aderência e invasão das células humanas.

## **Invasão**

A capacidade de *Campylobacter* penetrar, sobreviver e replicar-se nas células dos mamíferos tem sido alvo de extensivos estudos (Rivera-Amill, Kim, Seshu & Konkel, 2001).

A capacidade deste microrganismo invadir as células epiteliais intestinais depende principalmente da estirpe envolvida (Rivera-Amill, Kim, Seshu & Konkel, 2001).

A invasão por *Campylobacter* spp. ocorre por endocitose, processo mediado por receptores que se encontram na membrana celular. Estes receptores estão associados à proteína do citoplasma, clatrina, que forma uma depressão na membrana. Quando este receptor se liga ao *Campylobacter*, esta depressão aumenta e transforma-se em vacúolos citoplasmáticos (Bhavsar & Kapadnis, 2007; Levin, 2007).

Posteriormente este vacúolo migra através da lâmina própria e *Campylobacter* é libertado, desencadeando um processo inflamatório (Bhavsar & Kapadnis, 2007; Levin, 2007)

Este processo inflamatório, manifesta-se através de diarreia, por vezes sanguinolenta, caracterizada por um infiltrado inflamatório com neutrófilos e células mononucleares e febre (Hu & Kopecko, 2000).

## **Toxinas**

Levin (2007) refere que, o processo de caracterização das toxinas produzidas por *Campylobacter* tem sido relativamente lento, existindo alguma confusão no que diz respeito ao número e especificidade de factores tóxicos produzidos por este agente, uma vez que podem derivar de uma grande variedade de estirpes e condições culturais.

As toxinas podem ser classificadas em duas classes, dependendo do mecanismo de acção: enterotoxina e citotoxina (Konkel *et al.*, 2001).

As enterotoxinas são proteínas secretadas com capacidade de se ligarem a receptores celulares, penetrando na célula e aumentando os níveis de AMP cíclico intracelular. Esta toxina também designada por toxina citotónica, é biologicamente e imunologicamente semelhante à toxina colérica (CT), detectada nas estirpes de *Vibrio cholerae* e à toxina termolábil (LT), característica da *Escherichia coli* (Konkel *et al.*, 2001; Friis, Pin, Peason & Wells, 2005).

A toxina do tipo *Vibrio cholerae* e a toxina termolábil da *Escherichia coli* apresentam 2 subunidades: subunidade A, que é responsável pela actividade enzimática e uma subunidade B, que liga ao receptor gangliosido GM1 (Konkel *et al.*, 2001).

Após a ligação ao receptor GM1, a subunidade A é transportada para dentro da célula, ocorrendo activação proteolítica, com posterior desregulação do sistema adenilato ciclase. Como resultado, verifica-se um aumento dos níveis do AMP cíclico e alteração do fluxo de iões, ocorrendo diarreia aquosa (Konkel *et al.*, 2001; Levin, 2007).

A actividade das enterotoxinas pode ser demonstrada “*in vitro*” através do alongamento das Células Ováricas de Hamster Chinês (CHO), ou do arredondamento das células tumorais da adrenocortical de ratos (Y1) ou ainda da avaliação dos níveis intracelulares de AMP cíclico, que provocam a acumulação de fluido a nível intestinal (Levin, 2007).

O método frequentemente utilizado na detecção das enterotoxinas é a técnica de ELISA (Enzyme-Like Immunosorbent Assay), na qual o gangliósido GM1 constitui a fase sólida e os soros anti-LT e anti-CT, os anticorpos (Levin, 2007).

As citotoxinas destroem as células alvo e podem actuar intracelularmente ou através da formação de poros nas células, inibindo a síntese de proteínas celulares e a formação de filamentos de actina (Konkel *et al.*, 2001; Levin, 2007).

Existem vários tipos de citotoxinas, das quais se destacam: 70kDa, CDT (Toxina Distensora Citoletal), Shiga-like toxina, toxina hemolítica e hepatotoxina (Wassenar, 1997; Levin, 2007). Segundo vários estudos reportados por Levin (2007), as citotoxinas com 70 kDa são sensíveis ao calor e à tripsina, são activas contra as células HeLa, CHO e células INT407 e inactivas na presença das células Vero.

A CDT tem demonstrado uma grande capacidade de distensão progressiva de várias linhas celulares e devido à sua elevada citotoxicidade, provoca morte das mesmas (Bang *et al.*, 2001).

A toxina CDT é composta por três genes: *CdtA*, *CdtB* e *CdtC*, que codificam proteínas de 30, 29 e 21 kDa, respectivamente. O gene *CdtA* apresenta homologia com a cadeia B da ricina, o *CdtB* é homólogo às enzimas que contêm actividade fosfo-esterásica incluindo as nucleases e o *CdtC* é muito semelhante em homologia com o primeiro gene (Hassane, Lee, Mendenhall & Pickett, 2001).

Estes genes estão associados à membrana bacteriana externa e regulam a actividade da CDT, sendo que o gene *CdtB* é o componente activo, enquanto que *CdtA* e *CdtC* estão envolvidos na transmissão das moléculas do *CdtB* às células (Konkel *et al.*, 2001; Ohara, Oswald & Sugai, 2004).

Em estudos realizados *in vitro* o gene *CdtB* apresenta actividade com características semelhantes às nucleases, exerce o seu efeito danificando o DNA celular, o que resulta na divisão celular de G<sub>2</sub>/M (Hickey *et al.*, 2000; Lara-Tajero & Galan, 2000).

Quando o gene *CdtB* foi microinjectado nas células do hospedeiro, verificou-se que este era capaz, por si só, de causar todos os efeitos tóxicos da holotoxina CDT, incluindo a distensão citoplasmática e a restrição das células G<sub>2</sub>/M (Lara-Tajero & Galan, 2000).

No caso dos três genes acima mencionados estarem combinados, estes interagem entre si, formando uma holotoxina activa, que apresenta uma elevada toxicidade celular, causando infecção (Lara-Tajero & Galan, 2000).

### 1.5.1. Manifestações Clínicas

A doença no homem resulta do consumo de produtos alimentares contaminados com microrganismos patogénicos, sendo *Campylobacter* spp. a principal causa de gastroenterite, originando assim problemas a nível da saúde pública e perdas económicas relacionadas com a diminuição da produtividade e custos com tratamentos (Whyte *et al.*, 2004)

A dose infectante relativamente baixa, as manifestações clínicas e as sequelas potencialmente graves que caracterizam esta patologia, confirmam a importância desta zoonose como um perigo significativo para a saúde (Amri *et al.*, 2007).

Apesar das elevadas taxas de prevalência desta doença no homem, esta raramente é fatal (Wingstrand *et al.*, 2006).

O período de incubação é de 2 a 5 dias, podendo variar entre 1 a 10 dias, originando infecções ligeiras a moderadas (Anónimo, 2005b).

As infecções geralmente são agudas e auto-limitantes, com a duração de 3 a 5 dias, manifestando-se por diarreia (frequentemente com sangue), dor abdominal, febre, dor de cabeça, náuseas e/ou vômitos. Em alguns casos a sintomatologia pode durar até uma semana e na maioria das vezes não é necessário o uso de antibióticos. No entanto, quando os sintomas são severos ou prolongados, é necessário recorrer a tratamento (Sallam, 2007; Liu, Han, Li & Song, 2006).

Em alguns países, incluindo Portugal, é frequentemente utilizado o uso de antibióticos para o tratamento de gastroenterites. Nos adultos, a escolha do tratamento recai sobretudo no uso de quinolonas, no entanto segundo Vicente *et al.* (2008), este medicamento não tem qualquer efeito sobre o *Campylobacter*, uma vez que, devido ao uso recorrente do mesmo, este agente já desenvolveu resistências à ciprofloxacina (80,5%), não se recomendando a sua utilização.

Segundo Shane e Stern (2003), podem ser observados dois tipos de diarreia nas infecções por *Campylobacter jejuni*, nomeadamente diarreia não inflamatória e inflamatória, por vezes sanguinolenta e caracterizada por um infiltrado inflamatório com neutrófilos e células mononucleares, degeneração e atrofia das vilosidades, perda de muco, formação de abscessos nas criptas e ulceração da mucosa do epitélio.

No trabalho realizado por Al-Shamahy *et al.* (2007), 86,6% das pessoas com campilobacteriose manifestaram dores/cólicas abdominais, acompanhadas por diarreia aquosa (77,6%) ou por diarreia mucóide sanguinolenta. Apenas 21 % dos pacientes apresentaram febre.

Pode ocorrer infecção sistémica por campilobacteriose, tendo sido relatados casos em menos de 1 % dos doentes. Os indivíduos mais susceptíveis a esta infecção são os idosos, as crianças e os indivíduos imunodeprimidos (Oldfield & Wallace, 2001).

A ocorrência de complicações é rara, contudo podem surgir meningite, endocardite, colecistite aguda, adenite mesentérica, apendicite e aborto séptico (Oldfield & Wallace, 2001 & Anónimo, 2005b).

As sequelas da campilobacteriose mais relevantes incluem o síndrome de Guillan-Barré, síndrome de Reiter's (artrite reactiva) e síndrome hemolítico urémico (Gillespie *et al.*, 2002). A forma mais grave é o síndrome de Guillan-Barré, que se caracteriza por uma doença inflamatória auto-imune com perda de mielina dos nervos periféricos e das raízes nervosas, resultando em paralisia neuromuscular aguda (Nachamkin, 2002; Shane & Stern, 2003).

A incidência desta complicação é baixa, uma vez que se estima que em 1000 pessoas apenas se manifeste numa (Dingle, Van Den & Colles, 2001; EFSA, 2005).

A artrite reactiva ou síndrome de Reiter's geralmente ocorre 7 a 10 dias após sintomatologia diarreica. De salientar que se desconhece a frequência de aparecimento desta sequela, no entanto segundo um estudo realizado na Finlândia, foram confirmados laboratorialmente, 45 de um total de 609 (7%) casos com esta patologia, resultante da infecção por campilobacteriose (Altekruse & Tollefson, 2003).

O contacto permanente com *Campylobacter* spp. confere imunidade ao hospedeiro, ocorrendo, por vezes, infecções assintomáticas, porém o mecanismo e duração desta imunidade não é conhecida (Altekruse & Tollefson, 2003).

O diagnóstico laboratorial de *Campylobacter* spp. e a determinação da resistência aos antibióticos é importante para o tratamento das pessoas infectadas, no entanto, a distinção entre as duas espécies mais prevalentes nos humanos, nomeadamente *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* é igualmente importante para promover o controlo e vigilância epidemiológica (Persson & Olsen, 2005).

#### **4. INTERVENÇÕES “DO PRADO AO PRATO” PARA PREVENIR A CONTAMINAÇÃO POR *CAMPYLOBACTER* SPP.**

O controlo da campilobacteriose passa essencialmente pela compreensão e conhecimento profundo e detalhado dos seus aspectos epidemiológicos, desde a fonte de contaminação, aos hospedeiros humanos, passando pelos mecanismos de patogenicidade e respectiva dose infectante (Gillespie *et al.*, 2002; Wassenaar & Newell, 2006).

Segundo o Anexo I da Directiva 2003/99/CE é obrigatória a vigilância epidemiológica desta zoonose por todos os Estados Membros, de modo a se constituir um pilar importante para uma política integrada de segurança alimentar. Outra ferramenta importante para fomentar o controlo da segurança alimentar consiste na avaliação quantitativa dos riscos microbiológicos, sendo o seu uso estimulado por diversos organismos internacionais, tais como, Organização Mundial de Saúde (WHO), Codex Alimentarius, World Trade Organization

(WTO) e Food and Agricultural Organization of the United Nation (FAO). A avaliação do risco permite uma abordagem estruturada e unificada, bem como uma base científica para decisões a nível da gestão de risco (Nauta *et al.*, 2009).

A harmonização do sistema de avaliação de risco tornou-se uma prioridade na União Europeia, de modo a permitir uma comparação da situação de campilobacteriose nos diferentes Estados Membros e apoiar intervenções de gestão de risco pela Comissão Europeia (Nauta *et al.*, 2009).

Em Portugal, as explorações avícolas têm implementado medidas que impedem o contacto com outras aves, bem como sistemas obrigatórios de limpeza e desinfecção que permitem manter as aves saudáveis e obter carne sanitariamente segura (DGV, 2009).

Segundo Potturi-Venkata *et al.* (2007), é importante e necessário o controlo de *Campylobacter* spp. nos animais “*in vivo*”, no sentido de minimizar a contaminação nos produtos finais. A redução da colonização nos bandos é a estratégia ideal para controlar e prevenir a campilobacteriose nos humanos (Ridley *et al.*, 2008).

Assim, para prevenir a contaminação dos bandos é recomendada a implementação de medidas rigorosas de biossegurança e de controlo tanto nas explorações avícolas como a nível do abate e processamento das carcaças (EFSA, 2005; Baré, 2009).

Shane e Stern (2002), referem que a utilização e intensificação das medidas de controlo de *Salmonella* spp. podem contribuir para a redução da exposição dos bandos a *Campylobacter* spp., uma vez que alguns dos mecanismos de transmissão destes agentes são comuns.

A aplicação de medidas específicas de gestão, higiene e biossegurança ajudam a prevenir a contaminação inicial por *Campylobacter*, no entanto estas raramente são efectivas ao longo de toda a vida produtiva dos animais, uma vez que é frequente a recontaminação dos bandos, devido à elevada exposição a este agente, baixa dose infectante e elevada taxa de transmissão entre bandos contaminados e não contaminados (Pattison, 2001; Newell & Fearnley, 2003; Colles *et al.*, 2008).

A implementação de medidas de biossegurança tem como objectivo identificar e controlar as vias de entrada dos agentes nas explorações, através das pessoas (tratadores, fornecedores e técnicos), veículos pessoais e de transporte de mercadorias avícolas ou de aves vivas, outros animais (aves silvestres, insectos, murideos e animais domésticos), água de abastecimento e alimentos compostos (Costa, 2008).

Estas medidas incluem a aplicação sistemática do princípio “all in/all out”, isto é de um vazio sanitário de pelo menos duas semanas, para se proceder à limpeza e desinfecção das instalações. Assim, deve-se igualmente proceder à remoção das camas, penas, restos de fezes e poeiras, sendo estes posteriormente encaminhados para sistemas de tratamento, tais como compostagem, sistemas de biogás, deposição em aterro e incineração. Todos os locais, equipamentos, utensílios, veículos de transporte (rodilúvios), vestuário e calçado que



estiveram em contacto com as aves deverão ser desinfectados, de preferência com a utilização consecutiva de dois desinfectantes (DGV, 2005; Baré *et al.*, 2009).

O alojamento das aves deve ser desenhado de modo a prevenir a entrada de outros animais exteriores à exploração e deverão ser implementadas medidas para controlo de pragas. O acesso a pessoas exteriores à exploração deve ser limitado, e deverão ser promovidas medidas de higiene aos tratadores e pessoas afins da exploração, tais como desinfeção do equipamento, principalmente das botas, e lavagem das mãos (Cox & Pavic, 2009).

Sendo a água contaminada/não tratada um dos reservatórios de *Campylobacter*, é premente impedir a entrada deste agente na exploração, disponibilizando água potável ou em alternativa proceder ao tratamento da mesma, através da clorinação (2-3 ppm), de sistemas de filtração ou de osmose reversa, bem como pela utilização de produtos químicos (Cox & Pavic, 2009).

No entanto, é necessário proceder à limpeza e desinfeção regular dos sistemas de água, de modo a prevenir a formação de biofilmes (Kalmokoff *et al.*, 2006).

Um estudo realizado por Byrd, Hargis e Cadwell (2001) refere que, a aplicação de um tratamento com ácido láctico na água de bebida, durante 8 horas antes do abate, reduz a frequência de contaminação da carcaça em 15 %.

Apesar da alimentação não ser vista como um importante veículo para a infecção por *Campylobacter* é recomendada a peletização com pasteurização e adição de ácidos orgânicos. De acordo com o estudo elaborado por Heres, Engel, Urlings, Wagenaar e van Knapen (2004), a suplementação com ácidos orgânicos reduz visivelmente a concentração fecal de *Campylobacter*, contudo apresenta alguns efeitos adversos, suprimindo o crescimento das aves.

Horrocks *et al.* (2008), referem que a administração de bacteriocinas e de aditivos aos alimentos são eficazes na redução da concentração de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*, bem como a utilização de probióticos, exclusão competitiva e a vacinação dos bandos. A exclusão competitiva é baseada na administração oral de culturas mistas de bactérias, no sentido de fomentar a resistência à infecção.

A carne de frango é estéril, tornando-se contaminada a nível do matadouro, principalmente por contaminação fecal e contaminações cruzadas entre as carcaças, equipamentos, infraestruturas e magarefes, pelo que é necessário um reforço das medidas de controlo (Gellynck *et al.*, 2008).

As operações de abate que provocam maiores níveis de contaminação das carcaças são o escaldão, depena, evisceração, lavagem e refrigeração, sendo premente uma actuação mais direccionada nestas etapas e uma vigilância microbiológica mais acentuada, através de análises frequentes (Stern & Robach, 2003).

Os sprays de alta pressão para lavagem das carcaças e remoção de conteúdo fecal deverão ser providos de água potável/clorinada, no sentido de minimizar a contaminação por

*Campylobacter*. Num estudo realizado nos Estados Unidos constatou-se que a adição de fosfato de trisódio nestes sprays de lavagem, também é eficaz na redução dos níveis de *Campylobacter* nas carcaças, tendo-se verificado uma redução do teor de contaminação de 78% para 46% (Shane & Stern, 2003).

A água do escaldão também pode promover a disseminação deste agente pelas carcaças, devido à presença de restos de matérias fecais nas aves. O controlo da temperatura da água do escaldão é um ponto crítico que deve ser considerado, uma vez que apesar da sua elevada temperatura (50-52°C ou 56-58°C), alguns microrganismos podem permanecer activos, sendo assim necessária a desinfecção do tanque de escaldão e a mudança frequente da água (EFSA, 2005).

Durante a depena e a evisceração usualmente ocorre um aumento da contaminação por *Campylobacter*, devido à expulsão do conteúdo cecal ou ruptura das vísceras. Berrang, Smith, Winham & Feldner (2004), refere que pequenas quantidades de matéria fecal, podem originar um significativo aumento do número de *Campylobacter* nas carcaças. Em situações em que o intestino permanece intacto durante este processo, verifica-se igualmente elevados níveis de bactérias entéricas, incluindo *Campylobacter*, no exterior das carcaças.

As operações finais de lavagem e arrefecimento das carcaças reduzem a contaminação por *Campylobacter* spp. Antes da refrigeração, deve-se proceder a uma lavagem interna e externa das carcaças, no sentido de remover alguns restos de material fecal. Constatou-se que após esta operação o número de *Campylobacter* presente na superfície das carcaças tinha reduzido para cerca de 90% (EFSA, 2005).

A refrigeração por imersão apresenta uma maior eficácia na redução deste microrganismo, apesar de poderem ocorrer contaminações cruzadas. Nos Estados Unidos da América, esta água de imersão deve conter cloro, fosfato de sódio acidificado, ácido acético ou trisódio fosfato. Para melhorar a eficiência deste processo e minimizar o transporte de agentes patogénicos, deve ser utilizado um fluxo de água gelada em contra corrente, à semelhança do escaldão (Sanchez, Fluckey, Brashears & McKee, 2002; Cox & Pavic, 2009).

Devido a maiores exigências dos consumidores por produtos mais saudáveis, sem recurso a tratamentos químicos, tem sido amplamente utilizada a refrigeração por ar frio, uma vez que esta diminui o risco de contaminação cruzada e reduz a carga microbiana. De salientar que, em alguns tratamentos experimentais utilizou-se o vapor, tendo-se obtido os mesmos resultados (Cox & Pavic, 2009).

Os produtos finais, carcaça inteira ou as suas partes, podem ser armazenados a temperaturas inferiores a 4°C ou congelados (-18°C a -20°C), sendo que a primeira reduz a contaminação para 0,6 log<sub>10</sub> a 1,0 log<sub>10</sub> ufc/g, enquanto que na segunda os níveis de contaminação encontram-se entre 0,65 log<sub>10</sub> e 2,76 log<sub>10</sub> ufc/g (EFSA, 2005; Georgsson, Porkelsson, Geirdottir, Reiersen & Stern, 2006).

Outro método de descontaminação das carcaças consiste na irradiação gama, tendo-se obtido uma diminuição da contaminação por *Campylobacter jejuni* de 6 log para uma dose de 2 kilogreys (Shane & Stern, 2003). Contudo a aplicação deste processo só está autorizado nos Estados Unidos da América. De salientar que, apesar de ser eficaz na redução da contaminação deste agente, os consumidores manifestam alguma resistência ao consumo dos produtos sujeitos à radiação, uma vez que consideram que a carne apresenta uma cor e textura alterada e que são destruídas as vitaminas presentes na mesma. De referir que, actualmente existem mecanismos que tornam a carne resultante deste processo mais segura e indistinguível das outras carnes, sendo necessário o uso apropriado de aditivos, temperatura e escolha do tipo de atmosfera a utilizar na embalagem (Shane & Stern, 2003; O'Bryan, Crandall, Ricke & Olson, 2008).

Para avaliar a precisão e eficácia das estratégias de intervenção ou risco associado ao transporte de agentes patogénicos na produção e processamento, é necessário o acompanhamento através da realização de exames microbiológicos e métodos analíticos (Cox & Pavic, 2009).

Segundo a EFSA (2005), apesar do processamento das carcaças no matadouro diminuir substancialmente a contaminação por *Campylobacter*, os produtos finais apresentam valores de 1 log<sub>10</sub> a 4 log<sub>10</sub> UFC/g. Assim, a diminuição do risco de contágio para o consumidor passa pela aplicação de boas práticas de manipulação e de higiene em casa, isto é evitando contaminações cruzadas na cozinha, através da lavagem e possível desinfecção dos utensílios e superfícies que entram em contacto com a carne crua e posteriormente com outros alimentos, lavagem correcta e adequada das mãos, e evitar o contacto dos alimentos confeccionados e prontos a comer com animais domésticos. Aconselha-se igualmente o armazenamento da carne crua separada dos outros alimentos, bem como uma adequada confecção da mesma, devendo atingir uma temperatura interior de 82°C (Altekruse & Tollefson, 2003; Wilson *et al.*, 2008; Gromley *et al.*, 2008).

O papel do médico veterinário é primordial na implementação e manutenção de estratégias para promover a segurança alimentar e minimizar o impacto da campilobacteriose no homem (Altekruse & Tollefson, 2003).

**PARTE II**  
**TRABALHO EXPERIMENTAL**

# **AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR *CAMPYLOBACTER* SPP. EM PEITOS DE FRANGO EMBALADOS EM ATMOSFERA PROTECTORA E EM SUPERFÍCIES DO AMBIENTE FABRIL**

## **1. OBJECTIVOS**

O *Campylobacter* spp. tem sido reconhecido como um microrganismo emergente de origem alimentar, sendo considerado a causa mais frequente de doenças gastrointestinais de origem bacteriana em humanos (Ellis-Iversen *et al.*, 2009).

Persson & Olsen (2005) referiram que as principais fontes de infecção consistem na ingestão de alimentos de origem animal e particularmente a carne de frango.

De acordo com o relatório da EFSA (2009), a incidência desta infecção tem vindo a aumentar significativamente em todo o mundo e como em Portugal não existem dados oficiais sobre a mesma, considerou-se pertinente elaborar um estudo sobre a avaliação da contaminação por *Campylobacter* spp. em peitos de frango e em superfícies do ambiente fabril (sala de desmancha).

O presente trabalho tem como principal objectivo determinar a frequência e nível de contaminação de *Campylobacter* spp. em peito de frango embalado em atmosfera modificada/protectora e em superfícies de contacto directo e indirecto de uma sala de desmancha após a respectiva higienização.

Pretende-se igualmente avaliar a qualidade higio-sanitária da carne de frango e do ambiente fabril, tendo por base a contagem de *Enterobacteriaceae*, como indicador de higiene do processo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Colheita de Amostras**

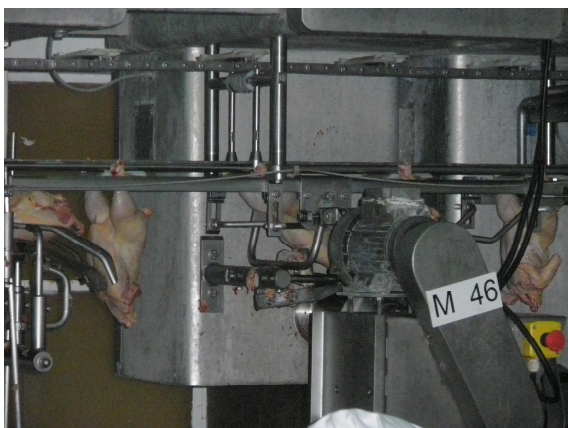
#### **2.1.1. Amostras de peito de frango**

As amostras de peitos resultantes da desmancha de carcaças de frango (Broilers), de produção intensiva, foram recolhidas em diferentes dias de desmancha, após as operações de abate num Matadouro Industrial de Aves, durante um período de seis meses (Fevereiro a Agosto de 2009).

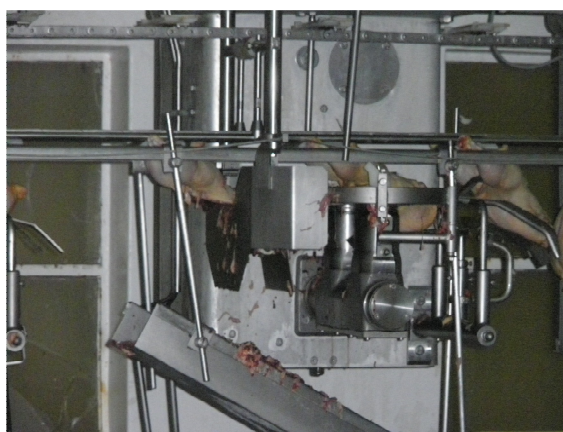
Após as etapas de pendura, insensibilização, sangria, escaldão, depena, evisceração, lavagem e arrefecimento, as carcaças eram colocadas durante 24 horas numa câmara

frigorífica entre 0°C a 4°C, para estabilização da temperatura. Sequencialmente, eram colocadas automaticamente nos ganchos e seguiam pelo transportador aéreo até à sala de desmancha, cuja temperatura estava compreendida entre os 10°C e os 12°C. Neste local, eram primeiro sujeitas ao corte das asas (Figura 11), de seguida ao corte do peito (Figura 12) e por fim das pernas (Figura 13). Os peitos que circulavam pelo tapete, eram retirados por um funcionário que os passava por uma lâmina para retirar a pele e posteriormente eram colocados em cuvetes e embalados em atmosfera modificada.

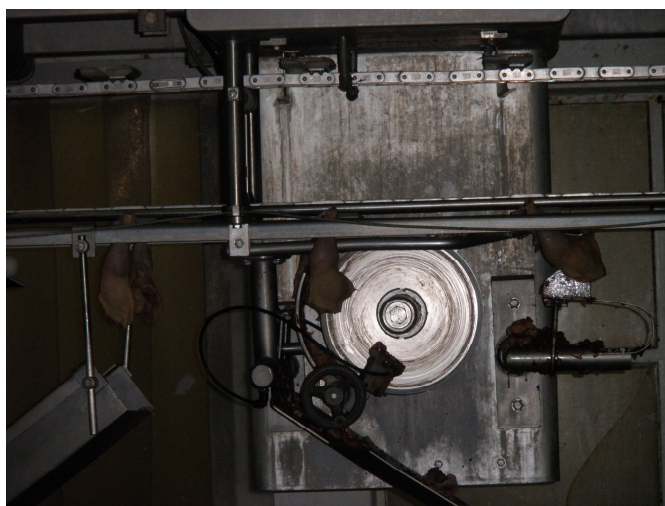
**Figura 11 – Corte das asas**



**Figura 12 – Corte dos peitos**



**Figura 13 – Corte das pernas**



As cuvetes (B22-50, Coopbox Hispania S.L.U, Espanha) utilizadas (Figura 14) eram próprias para uso alimentar e apresentavam uma estrutura rectangular, constituída por três lâminas: lâmina exterior de poliestireno expandido (EPS), lâmina central em poliestireno expandido de elevado impacto (HIPS) e lâmina interior com uma película de barreira de polietileno (PE). Na

sua base continham ainda um papel absorvente de humidade do tipo ABS (Coopbox Hispania S.L.U, Espanha).

**Figura 14** – Peito de frango embalado em cuvete sob atmosfera protectora



Para a embalagem foram utilizados dois tipos de filme, nomeadamente retráctil (Toplex HB SP Shrink, Plastopil, Israel) e de selagem (Toplex HB, Plastopil, Israel).

A selagem das embalagens era feita com uma termoseladora (Reepack, Itália), sendo utilizada uma mistura comercial de gases (“Extendapak – 43”, Praxair, Portugal), cujos componentes se encontravam nas seguintes proporções: 70% Oxigénio ( $O_2$ ), 20% Dióxido de Carbono ( $CO_2$ ) e 10% de Azoto ( $N_2$ ).

Por fim, as embalagens eram pesadas, etiquetadas e armazenadas na câmara de refrigeração entre 0°C a 4°C. De salientar que, após a data de embalagem, este produto tinha uma validade de cinco dias.

Os peitos de frango que foram seleccionados ao acaso pertenciam a lotes diferentes de abate ( $n=21$ ) e foram sujeitos a análise microbiológica após um armazenamento de 72 horas. O transporte das amostras para o laboratório foi feito em caixa isotérmica com termoacumuladores.

#### 2.1.2. Amostras de superfícies do ambiente fabril

As amostras das superfícies de contacto da sala de desmancha foram recolhidas em dias diferentes após a higienização das instalações, isto é, após a respectiva limpeza e desinfecção.

Diariamente, era feita uma limpeza alcalina às paredes, pavimentos e máquinas. Semanalmente, procedia-se a uma limpeza ácida e desinfecção, de acordo com o Plano que se encontra em anexo (ANEXO I).

A limpeza diária compreendia as fases de lavagem com água, para remoção de todos os resíduos de alimentos das instalações e equipamento, de aplicação do detergente alcalino a 3% (*Supervix A*, Proquimia, Portugal), e por fim, a de enxaguamento das superfícies com água potável.

Semanalmente era aplicado um detergente ácido a 2% (*Desocal Foam*, Proquimia, Portugal) seguido de um desinfetante a uma concentração de 0,5% (*Prodesin 3*, Proquimia, Portugal), durante 10 a 15 minutos, sobre todas as superfícies limpas, para reduzir a carga microbiana das mesmas. De referir que, após cada uma destas etapas, era feito o enxaguamento com água potável.

As amostras de superfície de contacto foram recolhidas (n=21) de acordo com a ISO 18593:2004, após a higienização da sala de desmancha.

Para a contagem e pesquisa de *Campylobacter* spp. procedeu-se à recolha de amostras da parede, mesa, tapete, superfície de corte da pele do peito e das asas, enquanto que para a contagem de *Enterobacteriaceae* as amostras foram apenas da mesa e do tapete.

A colheita destas amostras foi feita de forma asséptica com o auxílio de uma esponja esterilizada (PVL, Portugal), a qual foi posteriormente introduzida num saco de *Stomacher*, devidamente identificado e encerrado.

As áreas recolhidas para contagem e pesquisa de *Campylobacter* spp. foram 900cm<sup>2</sup> (parede), 625cm<sup>2</sup> (mesa), 625cm<sup>2</sup> (tapete) e toda a superfície das lâminas para corte de asas e para retirar a pele do peito (a recolha foi feita por delimitação e posteriormente medida com fita métrica, sendo as áreas das lâminas calculadas através de fórmulas para determinação das áreas de uma circunferência, um triângulo e um rectângulo).

Quanto às superfícies destinadas à contagem de *Enterobacteriaceae*, foram obtidas amostras numa área de 100cm<sup>2</sup> (mesa e tapete), com o auxílio de um delimitador esterilizado.

O transporte das amostras de superfície para o laboratório foi feito em caixa isotérmica com termoacumuladores.

## **2.2. Preparação das Amostras para Análises Microbiológicas**

### **2.2.1. Amostras de peito de frango**

No laboratório preparou-se a suspensão-mãe para pesquisa e contagem de *Campylobacter* em amostras de peito de frango, utilizando o meio de enriquecimento selectivo Preston (Scharlau, Espanha), ao qual foi adicionado o suplemento “*Campylobacter* Broth Supplement (Liquid)” (Oxoid, Inglaterra), que continha piruvato de sódio (0,125 gramas), sulfato ferroso (0,125 gramas), metabissulfito de sódio (0,125 gramas) e água (2,0 mililitros) e o suplemento



“Modified Preston *Campylobacter* Selective Supplement” (Oxoid, Inglaterra) composto por polimixina B (2,500 IU), rifampicina (5,0 miligramas), trimetoprim (5,0 miligramas) e anfotericina B (5,0 miligramas), bem como 25 mililitros de sangue de cavalo desfibrinado, de acordo com a ISO/FDIS 10272-1:2005. Pesaram-se 25 gramas de amostra, tendo-se adicionado 225 mililitros de meio de enriquecimento Preston (suspensão-mãe).

Seguiu-se a preparação de uma diluição  $10^{-2}$  de cada amostra, medindo 9 mililitros de meio Preston (Scharlau, Espanha) e 1 mililitro da suspensão-mãe homogeneizada anteriormente.

Para a contagem de *Enterobacteriaceae* nas amostras de peito de frango, utilizou-se o soluto diluidor de Triptona-sal<sup>1</sup>. Para tal, pesaram-se 10 gramas desta amostra e adicionaram-se 90 mililitros de Triptona-sal. As preparações foram homogeneizadas no Stomacher 400 (Concessus, Portugal). Posteriormente, procedeu-se à preparação de diluições sucessivas,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  para cada amostra.

#### 2.2.2. Amostras de superfícies do ambiente fabril

A preparação das amostras de superfícies do ambiente fabril para pesquisa e contagem de *Campylobacter* spp. foi igualmente realizada de acordo com a ISO/FDIS 10272-1:2005.

Adicionaram-se 100 mililitros do meio Preston (preparado anteriormente) à esponja com que se efectuou a colheita e homogeneizou-se no Stomacher 400 (Concessus, Portugal). Foi preparada uma diluição  $10^{-2}$  de cada amostra, à semelhança do procedimento realizado para os peitos de frango.

Relativamente à contagem de *Enterobacteriaceae* das amostras de superfícies (mesa e tapete) utilizou-se o soluto diluidor Triptona-sal (100 mililitros). Posteriormente, procedeu-se à preparação de diluições sucessivas,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  para cada amostra (9 mililitros de Triptona-sal e 1 mililitro da suspensão homogeneizada).

### 2.3. Análises Microbiológicas

#### 2.3.1. Pesquisa de *Campylobacter* spp.

Seguindo a ISO/FDIS 10272-1:2005, incubou-se a suspensão inicial, em condições de microaerofilia (Genbox microaer, BioMérieux, França), numa caixa de anaerobiose (BioMérieux, França), durante 48 horas a 42°C.

---

<sup>1</sup> Para a preparação do soluto Triptona-sal pesaram-se 8,5 gramas de Cloreto de Sódio (Scharlau, Espanha) e 1 grama de Triptona (Scharlau, Espanha), aos quais se adicionou 1 litro de água. De seguida, acertou-se o pH a 7,0 e esterilizou-se a 121°C durante 15 minutos.

Após o período de enriquecimento, semeou-se o inóculo com o auxílio de uma ansa estéril de 10 microlitros de diâmetro (Normax, Portugal), por esgotamento em estrias, na superfície do meio de cultura selectivo, mCCD agar<sup>2</sup> (LAB, Reino Unido) e incubaram-se as placas, em microaerofilia (Genbox microaer, BioMérieux, França), a 42°C durante 48 horas.

Após o período de incubação, foram seleccionadas aleatoriamente as colónias que apresentavam uma morfologia característica da bactéria em estudo (colónias acinzentadas, algumas com brilho metálico, húmidas e achatadas), tendo sido repicadas 5 colónias suspeitas para o meio Columbia agar sangue (BioMérieux, França). Seguiu-se um período de incubação, em condições de microaerofilia, durante 24 a 48 horas à temperatura de 42°C, que permitiu o crescimento/desenvolvimento de colónias bem isoladas.

Posteriormente, para caracterização morfológica, seleccionaram-se colónias suspeitas isoladas de *Campylobacter*, e efectuaram-se esfregaços para coloração de Gram<sup>3</sup>, que depois foram observados ao microscópio óptico. Realizaram-se, posteriormente, para identificação das colónias suspeitas, as provas fenotípicas e genotípicas.

A expressão dos resultados obtidos foi feita através da indicação da “presença” ou “ausência” de *Campylobacter* em 25 gramas de peito de frango ou em função da área de superfície recolhida.

### 2.3.2. Contagem de *Campylobacter* spp.

A técnica utilizada para a contagem de *Campylobacter* spp. teve por base a ISO/FDIS 10272-2:2005.

Foi realizada uma sementeira por espalhamento à superfície do meio de cultura selectivo, mCCD agar (LAB, Reino Unido), com 0,5 ml da suspensão-mãe preparada a partir das amostras de peito e de superfícies de contacto (mesa, tapete, parede, lâmina para corte de asas e lâmina para retirar pele do peito) e respectivas diluições decimais ( $10^{-2}$ ). Seguiu-se um período de incubação de 48 horas em caixa de anaerobiose (BioMérieux, França), com geradores de microaerofilia (Genbox microaer, bioMérieux, França), a 42°C. Foram efectuadas as contagens das colónias suspeitas com base na sua morfologia típica (colónias acinzentadas, algumas com brilho metálico, húmidas e achatadas), cujo resultado foi expresso em log de ufc (unidades formadoras de colónias) de *Campylobacter* por grama.

Para confirmação das colónias de *Campylobacter* spp. suspeitas, foi realizado o procedimento descrito para a pesquisa de *Campylobacter* spp. (2.3.1), de acordo com a

---

<sup>2</sup> Ao meio básico mCCD agar adicionaram-se os suplementos antibióticos: cefoperazona (LAB M Limited, Reino Unido) e anfotericina B (LAB M Limited, Reino Unido).

<sup>3</sup> Para a coloração de Gram utilizou-se Violeta de Genciana (Scharlau, Espanha), Soluto de Lugol (Scharlau, Espanha), álcool para descolorar e Fuccina (Scharlau, Espanha)

ISO/FDIS 10272-1:2005, seguindo-se a identificação através de provas fenotípicas e genotípicas.

### 2.3.3. Contagem de *Enterobacteriaceae*

A contagem de *Enterobacteriaceae* foi realizada de acordo com a Norma Portuguesa 4137:1991.

Foi efectuada uma sementeira indirecta por incorporação de 1 ml das diluições decimais  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , preparadas das amostras de peito de frango e das superfícies de contacto (mesa e tapete), em meio de cultura VRBD “*Violet Red Bile Dextrose Agar*” (Biokar Diagnostics, França), previamente fundido e arrefecido a  $\pm 45^{\circ}\text{C}$  em banho-maria. Após solidificação do meio, as placas de Petri foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

No final da incubação, procedeu-se à contagem das colónias características (colónias bem isoladas de cor rosa a vermelha, mucosas), tendo os resultados sido expressos em log do número de unidades formadoras de colónias por grama ( $\log \text{ufc.g}^{-1}$ ).

### 2.3.4. Identificação/confirmação das espécies de *Campylobacter*

#### 2.3.4.1. Provas fenotípicas

Estas provas foram realizadas tanto para as colónias suspeitas isoladas e obtidas através de pesquisa de *Campylobacter* spp. como para as obtidas através do método de contagem directa.

Para caracterização dos isolados suspeitos de *Campylobacter* foram realizadas as provas de oxidase, catalase e de hidrólise do hipurato, descritas na Norma ISO/FDIS 10272-1:2005.

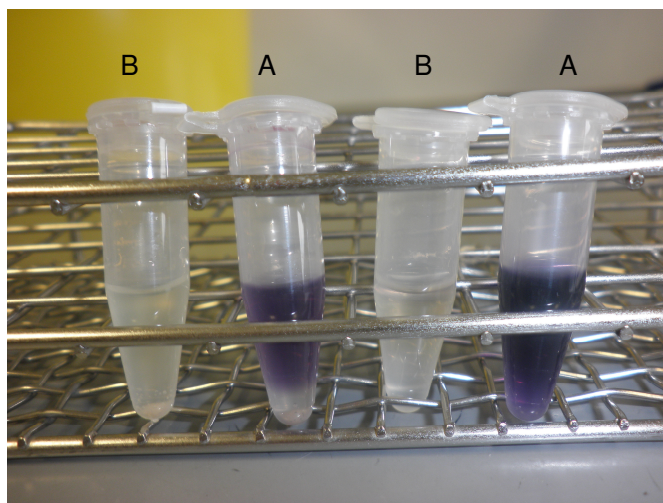
Para a realização da prova de oxidase utilizou-se um papel de filtro impregnado num reagente específico de oxidase (bioMérieux, França), no qual foi colocada uma colónia bem isolada de cada uma das culturas anteriormente mencionadas.

Para a detecção da catalase, foram colocados 0,05 mililitros de peróxido de hidrogénio (Vaz Pereira, Portugal) numa lâmina de microscópio, à qual com o auxílio de uma ansa se adicionou a colónia suspeita.

A prova da hidrólise do hipurato é um teste bioquímico que permite identificar *Campylobacter jejuni* das restantes espécies de *Campylobacter*, uma vez que apenas esta espécie consegue hidrolisar o hipurato (Persson & Olsen, 2005; Amri *et al.*, 2007). Assim e dando continuidade ao método descrito na ISO/FDIS 10272-1:2005, foi preparada uma suspensão de células bacterianas suspeitas seleccionadas, em tubos de hemólise com 0,4 ml de

solução aquosa de hipurato de sódio a 1% (Sigma, Estados Unidos da América). Estes foram incubados em banho-maria, durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, adicionou-se 0,2 ml de solução de ninidrina (Applichem, Alemanha), previamente preparada de acordo a Norma supracitada, incubou-se novamente em banho-maria durante 10 minutos a 37°C, e procedeu-se à observação. O aparecimento de uma coloração violeta escuro, indicou a positividade da reacção, enquanto que uma coloração de cor violeta clara ou a não alteração de cor, revelou uma reacção negativa (Figura 15). Como controlo positivo<sup>4</sup> utilizou-se *Campylobacter jejuni* Cb 218-99 e como controlo negativo, *Campylobacter coli* Zc20.

**Figura 15** – Reacções de hidrólise do hipurato positivas (A) e negativas (B)



Posteriormente, os isolados de *Campylobacter* suspeitos foram conservados em criotubos em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) a -80°C.

#### 2.3.4.2. Provas genotípicas: PCR *multiplex* para identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

Foi realizada a identificação molecular das duas espécies mais comuns de *Campylobacter* spp. (*Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*), através do método baseado na técnica de “PCR (Reacção em Cadeia pela Polimerase) *multiplex*”.

A extracção de DNA de amostra foi efectuada de acordo com o protocolo da QIAGEN, utilizando-se o QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Alemanha). Para tal adicionaram-se 20 µl de proteinase K (QIAGEN, Alemanha) às bactérias extraídas do meio de cultura e suspensas em 180 µl de tampão ATL (QIAGEN, Alemanha), incubando-se, de seguida, a 56°C, durante

<sup>4</sup> - Os controlos positivos e negativos foram gentilmente cedidos pela Dra. Eva Olsson do CRL (*Campylobacter* National Veterinary Institute – Sweden)

3 horas. Posteriormente, adicionaram-se 200 µl de tampão AL (QIAGEN, Alemanha), misturaram-se as suspensões no vórtex e incubaram-se a 70°C, durante 10 minutos. Após a adição de 200 µl de etanol a 99,6% e centrifugação (8000 rotações por minuto), transferiram-se as suspensões do tubo de *ependorf* (Eppendorf, Hamburgo) para colunas QIAamp Spin Column (QIAGEN, Alemanha). Às suspensões destas colunas adicionaram-se 500 µl de Buffer AW1 (QIAGEN, Alemanha), centrifugou-se a 8000 rotações por minuto e adicionaram-se 500 µl de Buffer AW2 (QIAGEN, Alemanha). Centrifugou-se novamente a 13,2 rotações por minuto durante 4 minutos e colocaram-se as colunas num novo tubo de *ependorf* (Eppendorf, Hamburgo) de 1,5 mililitros, incubou-se à temperatura ambiente durante 5 minutos e centrifugou-se a 8000 rotações por minuto.

De acordo com a metodologia descrita por Denis *et al.* (1999), o DNA da amostra foi amplificado, com base na utilização de três sequências de genes, *16S rRNA*, *mapA* e *ceuE*, para identificação do género *Campylobacter* e das espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, respectivamente. Foram necessárias duas condições para a escolha dos *primers*, nomeadamente a temperatura de fusão idêntica em todos os genes e a utilização de produtos de PCR com três pesos moleculares diferentes, de modo a possibilitar a sua distinção no gel de agarose, após a electroforese.

Seguindo a metodologia de Denis *et al.* (1999), foi preparada uma mistura com uma solução tampão fosfato, Cloreto de Magnésio (25mM), desoxirribonucleotídeos trifosfatos(guanina, adenina, timina e citosina - 10mM), e os *primers* MD16S1, MD16S2, MD mapA1, MD mapA2, MD col3 e MD col2 (10mM). A esta mistura foram ainda adicionados 5 µl de DNA da amostra e 5 U/µl da enzima *Taq polimerase* (Roche Diagnostics, França). Posteriormente, os tubos de PCR de 0,5 mililitros (Eppendorf, Hamburgo) que continham a mistura final foram colocados no termociclador “My Cyclor – thermal cyclor” (Bio-Rad, Laboratories, USA).

Para visualização dos produtos do PCR, realizou-se uma electroforese em gel de agarose a 1.5% (Figura 16), à qual se aplicou uma voltagem de 50 Volts, durante 60 minutos. Previamente, foi preparado o gel de agarose<sup>5</sup>, ao qual se adicionou brometo de etídio a uma concentração de 0,5 mg/ml (Sigma, Estados Unidos da América).

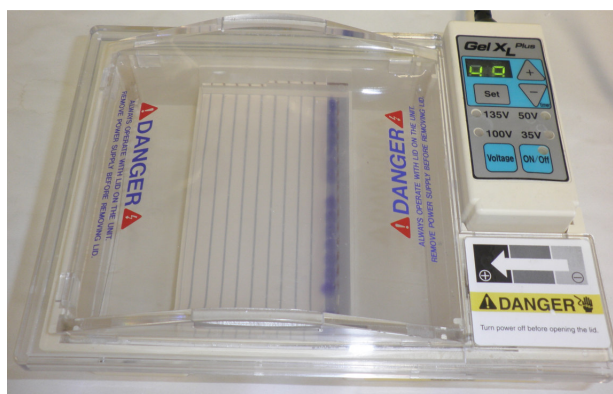
Após a migração dos fragmentos de DNA neste gel, procedeu-se à respectiva visualização sob luz ultravioleta (Image Master VDS, Pharmacia Biotech) e os resultados foram analisados.

A amplificação de sequências de DNA com 857 bp, 589 bp e 462 bp, permitiram identificar o género *Campylobacter*, e as espécies de *Campylobacter jejuni* e *coli*, respectivamente.

---

<sup>5</sup> Pesaram-se 1.5 gramas de agarose NA (GE Healthcare, Suécia), adicionaram-se 100 mililitros de Tampão TBE 1x e aqueceu-se a mistura até dissolução completa da agarose.

**Figura 16** – Electroforese em gel de agarose



### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi efectuada uma análise descritiva dos resultados, recorrendo ao programa Microsoft Office Excell 2007, no qual se obtiveram a média e desvio padrão das variáveis analisadas. Também foi utilizado o programa SPSS Statistics 17.0 para Windows, no qual se realizou uma análise de variância univariada designada por One-Way Anova, avaliando-se o efeito do dia de abate, produtor e tipo de embalagem, com um grau de confiança de 95%, para o parâmetro contagem de *Enterobacteriaceae*.

## 4. APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS

### 4.1. Avaliação da Segurança em Amostras de Peito de Frango: Pesquisa e Contagem de *Campylobacter* spp.

Os resultados relativos à pesquisa e contagem de *Campylobacter* spp. em peitos de frango provenientes de diferentes bandos e recolhidos em diferentes dias de abate, encontram-se descritos na Tabela 3.

Relativamente à pesquisa de *Campylobacter* spp. em 25 gramas de peito de frango, constatou-se a presença deste agente em 95% das amostras. A pesquisa da amostra do peito XIV revelou-se negativa, isto é não foi detectada a presença de *Campylobacter* spp. em 25 gramas de peito de frango, podendo tal facto ser devido a uma possível falha técnica durante as etapas de enriquecimento, isolamento ou confirmação. Este resultado corresponde a um falso negativo, uma vez que no procedimento relativo à contagem, esta amostra apresentou um nível de contaminação de 1,48 log ufc/g, tendo sido posteriormente confirmada a presença deste agente através da prova genotípica (PCR *multiplex*) como *Campylobacter jejuni*.

Na contagem de *Campylobacter* spp., as amostras de peito frango (n=21), apresentaram uma contaminação média de 0,98 log ufc/g e um desvio padrão de 0,89 log ufc/g. No entanto, salienta-se que a média das amostras que obtiveram contagem (n=13) foi de 1,59 log ufc/g, com um desvio padrão de 0,54 log ufc/g. Assim, 62% das amostras apresentaram um nível de contaminação por *Campylobacter* que permitiu a sua contagem.

Ao observar as contagens obtidas em cada dia de abate, verificou-se que as amostras de peito de frango correspondentes aos bandos abatidos em primeiro lugar, apresentavam um menor nível de contaminação por *Campylobacter* spp.

Do total de 21 amostras de peito de frango analisadas, constatou-se que a frequência de *Campylobacter* spp. foi de 100%.

Na Tabela 3 podemos observar que os resultados das provas de oxidase e catalase, realizadas para a identificação fenotípica das espécies, foram positivos para todos os isolados obtidos na contagem e pesquisa de *Campylobacter*.

O teste do hipurato efectuado foi positivo em 33,3% dos isolados testados para a pesquisa e em 28,6% dos isolados testados na contagem.

Posteriormente todos os isolados foram confirmados por PCR *multiplex*, tendo-se identificado as espécies *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*.

**Tabela 3** – Resultados da pesquisa e contagem de *Campylobacter* spp. em amostras de peito de frango

Amostra	Dia de Abate	Produtor	Bando	Catalase	Oxidase	Pesquisa	Espécies Identificadas na pesquisa	Contagem log ufc/g	Espécies Identificadas na contagem
I	17-02-2009	A	1	+	+	P	<i>C. coli</i>	1,3	<i>C. jejuni</i>
II	17-02-2009	B	2	+	+	P	<i>C. coli</i>	2,9	<i>C. jejuni</i>
III	06-03-2009	C	3	+	+	P	<i>C. coli</i>	1,48	<i>C. coli</i>
IV	06-03-2009	D	4	+	+	P	<i>C. coli</i>	1,9	<i>C. coli</i>
V	17-04-2009	E	5	+	+	P	<i>C. jejuni</i>	<0,7	*
VI	17-04-2009	D	6	+	+	P	<i>C. jejuni</i>	<0,7	*
VII	17-04-2009	E	7	+	+	P	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	1	N
VIII	04-05-2009	F	8	+	+	P	<i>C. jejuni</i>	1,84	<i>C. jejuni</i>
IX	04-05-2009	B	9	+	+	P	<i>C. jejuni</i>	2,18	<i>C. jejuni</i>
X	04-05-2009	A	10	+	+	P	<i>C. jejuni</i>	1	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
XI	04-05-2009	G	11	+	+	P	N	1,48	<i>C. jejuni</i>
XII	04-05-2009	H	12	+	+	P	<i>C. jejuni</i>	<0,7	*
XIII	05-05-2009	I	13	+	+	P	<i>C. jejuni</i>	1	N
XIV	05-05-2009	B	14	+	+	A	**	1,48	<i>C. jejuni</i>
XV	05-05-2009	G	15	+	+	P	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	1,78	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
XVI	05-05-2009	H	16	+	+	P	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	1,3	*
XVII	29-05-2009	J	17	+	+	P	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>	<0,7	*
XVIII	29-05-2009	H	18	+	+	P	<i>C. coli</i>	<0,7	*
XIX	29-05-2009	D	19	+	+	P	<i>C. jejuni</i>	<0,7	*
XX	26-06-2009	K	20	+	+	P	<i>C. jejuni</i>	<0,7	*
XXI	26-06-2009	L	21	+	+	P	<i>C. coli</i>	<0,7	*

**Legenda:**

+ - Prova Positiva

\* - Como a contagem foi <0,7 log ufc/g, não se procedeu à identificação das espécies

\*\* - Como se detectou a ausência de *Campylobacter* spp. em 25 gramas, não se procedeu à identificação das espécies

A - Ausência de *Campylobacter* em 25 gramas de peito de frango

P - Presença de *Campylobacter* em 25 gramas de peito de frango

N - Não foi identificada nenhuma espécie de *Campylobacter*

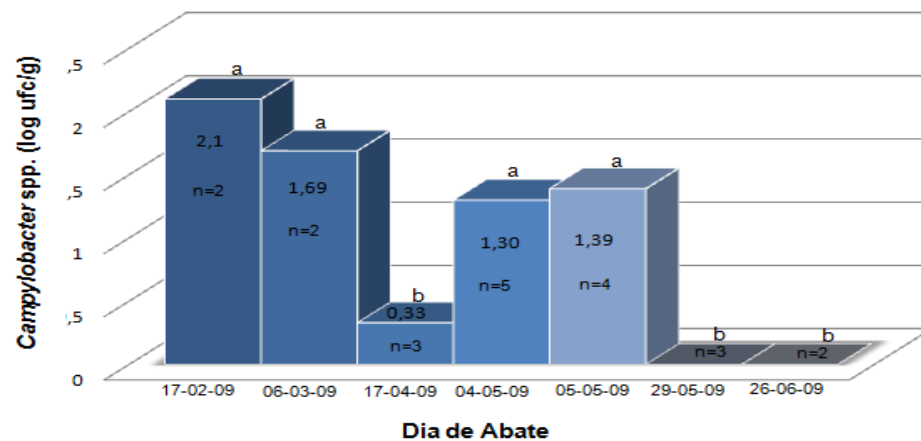
Na Figura 17 encontram-se representadas as contagens médias de *Campylobacter* spp. em amostras recolhidas de diversos bandos (n=21), nos diferentes dias de abate.

Os valores médios obtidos para os primeiros cinco dias de abate foram de 2,1 log ufc/g, 1,69 log ufc/g, 0,33 log ufc/g, 1,30 log ufc/g, 1,39 log ufc/g, respectivamente. Nos dois últimos dias, os teores médios de contaminação foram inferiores a 0,7 log ufc/g (limite de sensibilidade do método). Quanto ao desvio padrão, os valores para os dias em que se obtiveram contagens de *Campylobacter* spp. foram de 1,13 log ufc/g, 0,29 log ufc/g, 0,58 log ufc/g, 0,845 log ufc/g, 0,33 log ufc/g, respectivamente.

Nos diferentes dias de abate verificaram-se, para as contagens de *Campylobacter* em peito de frango, diferenças significativas (F=4,80; Significância=0,007), observando-se que as médias dos dias 17-02, 06-03, 04-05 e 05-05 são significativamente diferentes das observadas nos dias 17-04, 29-05 e 26-06.



**Figura 17** – Contagem média de *Campylobacter* spp. (log ufc/g) em amostras de peito de frango, em diferentes dias de abate (a, b – letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes para  $p < 0,05$ )

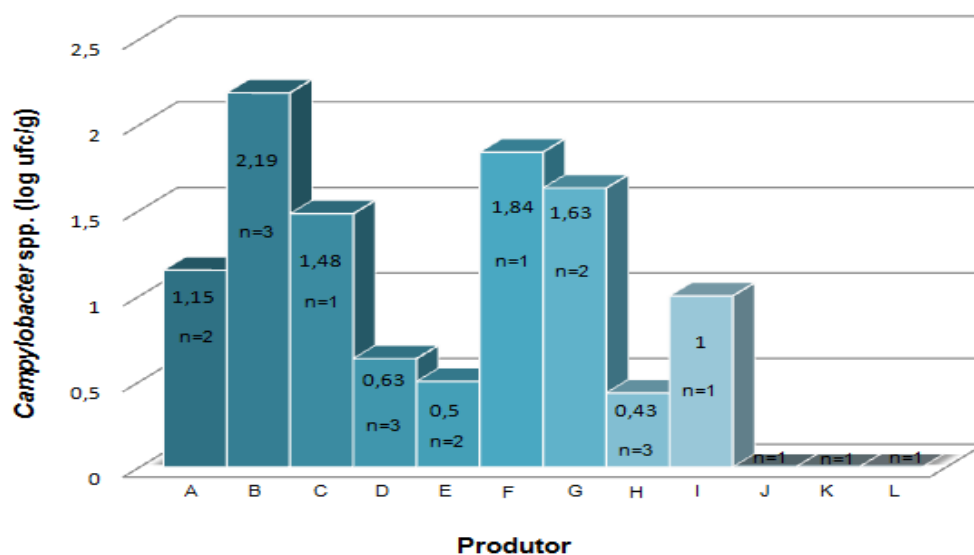


Na Figura 18 apresentam-se as contagens médias de *Campylobacter* spp. em cada uma das amostras de peito de frango, com origem em diferentes produtores.

Os níveis de contaminação médios obtidos nos diversos produtores (A, B, C, D, E, F, G, H, I) foram de 1,15 log ufc/g, 2,19 log ufc/g, 1,48 log ufc/g, 0,63 log ufc/g, 0,50 log ufc/g, 1,84 log ufc/g, 1,63 log ufc/g, 0,43 log ufc/g e 1,00 log ufc/g, respectivamente. De realçar que as amostras dos produtores J, K e L não apresentaram contagem (inferior a 0,7 log ufc/g – limite de sensibilidade do método).

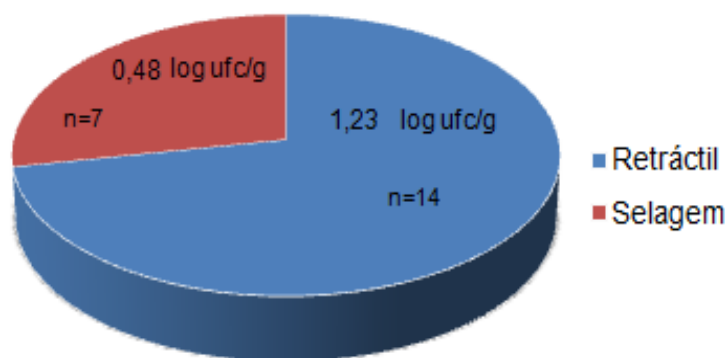
Ao relacionar os resultados dos diferentes grupos de produtores constatou-se que não existem diferenças significativas entre eles ( $F=1,73$ ; Significância=0,21).

**Figura 18** – Contagem média de *Campylobacter* spp. (log ufc/g) em amostras de peito de frango em função do produtor



Na Figura 19 estão representadas as contagens médias de *Campylobacter* spp. observadas em diferentes tipos de filme da embalagem em atmosfera protectora/modificada da carne. Desta forma, os teores médios foram de 1,23 log ufc/g nas embalagens do tipo retráctil e de 0,48 log ufc/g nas embalagens por selagem, não se verificando diferenças significativas entre eles ( $F=3,73$ ; Significância=0,07).

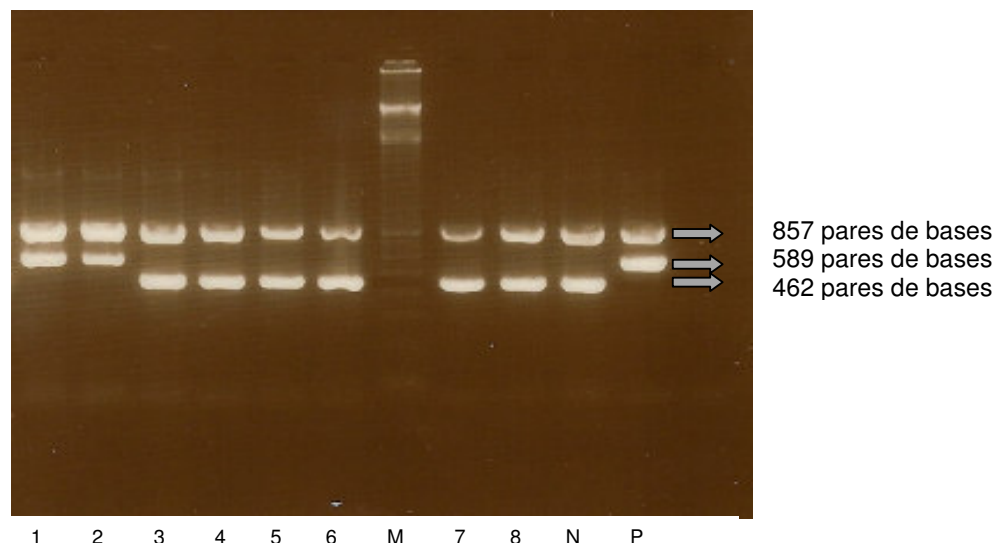
**Figura 19** – Contagem média de *Campylobacter* spp. (log ufc/g) em amostras de peito de frango obtidas em diferentes tipos de filmes da embalagem



Após a amplificação dos fragmentos de DNA obtidos a partir dos isolados ( $n=32$ ) das diferentes amostras em estudo, pela técnica de PCR *multiplex*, e respectiva visualização dos mesmos sob efeito de luz ultravioleta, foi possível identificar as duas espécies mais comuns de *Campylobacter*. Estes resultados foram posteriormente interpretados com base nos dados publicados no estudo de Denis *et al.* (1999), onde se descrevem os tamanhos dos fragmentos de DNA característicos do género *Campylobacter* (857 pares de bases) e das espécies *Campylobacter coli* (462 pares de bases) e *Campylobacter jejuni* (589 pares de bases).

Assim, ao observar a Figura 20 constata-se que os isolados 3, 4, 5, 6, 7, 8 correspondem ao género *Campylobacter* e à espécie *Campylobacter coli*, uma vez que ambas apresentam bandas com comprimentos de 857 e 462 pares de bases, respectivamente. Enquanto que, os isolados 1, 2 apresentam bandas com comprimentos de 857 e 589 pares de bases, referindo-se ao género *Campylobacter* e à espécie *Campylobacter jejuni*, respectivamente.

**Figura 20** – Identificação das espécies de *Campylobacter* pela técnica de PCR *multiplex* de alguns isolados das amostras de peito de frango (fotografia do gel de agarose)



**Legenda:**

1, 2 – *Campylobacter jejuni* (1 – isolado da amostra I [técnica contagem]; 2 – isolado amostra II [técnica de contagem])

3, 4, 5, 6, 7, 8, – *Campylobacter coli* (3 – isolado da amostra I [técnica de pesquisa]; 4 – isolado da amostra II (técnica pesquisa); 5 – isolado da amostra III [técnica contagem]; 6 – isolado da amostra IV [técnica contagem]; 7 – isolado da amostra III [técnica pesquisa]; 8 – isolado da amostra IV [técnica pesquisa])

M – Marcador (100 pares de bases)

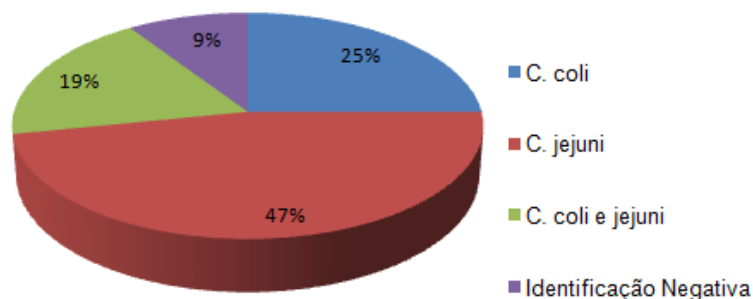
N – Controlo Negativo (*Campylobacter coli* ZC20)

P - Controlo Positivo (*Campylobacter jejuni* cb218-99)

A Figura 21 refere-se à frequência das espécies de *Campylobacter* nos diferentes isolados obtidos por PCR *multiplex*.

Dos 32 isolados das amostras de frango analisadas suspeitas de serem de *Campylobacter*, 47% foram identificados como *Campylobacter jejuni*, 25% como *Campylobacter coli* e 19% eram simultaneamente *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni*. De referir que destes isolados suspeitos, 9% não foram identificados como pertencentes ao género *Campylobacter*.

**Figura 21** – Frequência das espécies identificadas por PCR *multiplex*, a partir dos isolados provenientes da pesquisa e contagem de *Campylobacter* em amostras de peitos de frango



Estes isolados (n=32) de *Campylobacter* foram previamente identificados através do teste do hipurato, tendo-se obtido 19 (59, 4%) reacções negativas (coloração amarela ou violeta claro) e 13 (40,6%) reacções positivas (coloração violeta escuro), indiciando que se tratava de *Campylobacter jejuni*.

Comparando os resultados deste teste com os resultados do PCR multiplex, verificou-se que eles diferiram, uma vez que no segundo se identificaram 15 (47%) isolados compatíveis como *Campylobacter jejuni*, 8 (25%) como *Campylobacter coli* e 6 como *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. A diferença registada relativamente à identificação de *Campylobacter jejuni* pode ser justificada pelo facto de alguns dos isolados desta espécie não hidrolisarem o hipurato, dando origem a falsos negativos. Por outro lado, a identificação de *Campylobacter coli* não é possível através da identificação da hidrólise do hipurato por esta espécie não ter essa capacidade.

Tendo em conta estes resultados, é relevante referir que os métodos moleculares baseados no PCR são alternativas bastante fiáveis às metodologias convencionais (testes fenotípicos) para a detecção e identificação das estirpes de *Campylobacter* (Sallam, 2007).

#### 4.2. Avaliação da Higiene do Processo em Amostras de Peito de Frango

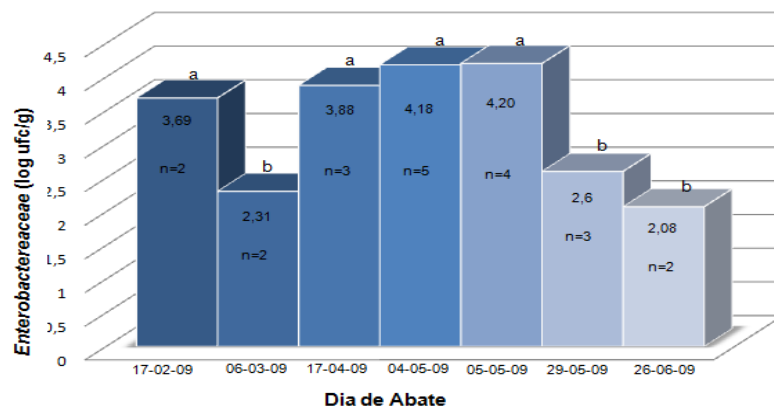
Para a avaliação higio-sanitária das condições de abate e respectivos produtos resultantes do mesmo, procedeu-se à contagem de *Enterobacteriaceae* em todas as amostras de peito de frango (n=21).

A contagem média deste agente nas amostras analisadas foi de 3,49 log ufc/g, com um desvio padrão de 0,96 log ufc/g.

Na Figura 22, encontram-se representados os teores médios de *Enterobacteriaceae* nos diferentes dias de abate, e pode-se verificar que o valor mínimo de contaminação foi de 2,08 log ufc/g no dia 26-06, sendo que o valor máximo ocorreu no dia 05-05 e foi de 4,20 log ufc/g.

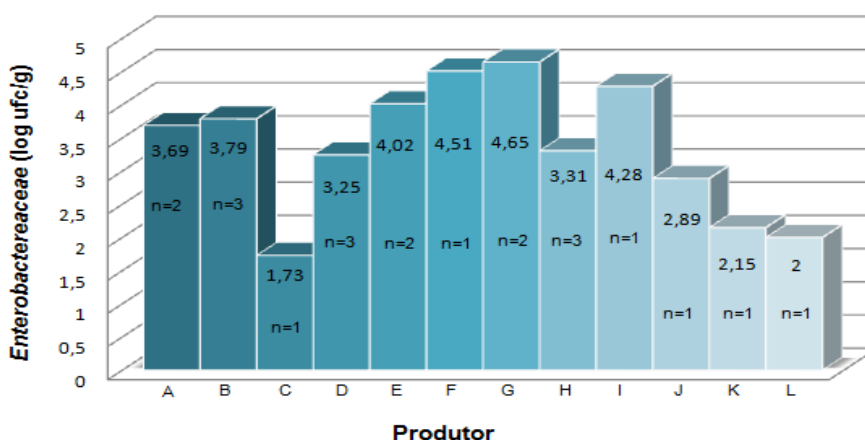
Após análise destes valores constatou-se que existem diferenças significativas ( $F=8,05$ ; Significância=0.001) para as médias de *Enterobacteriaceae* das amostras de peito de frango em diferentes dias de abate. Os resultados dos dias 17-02, 17-04, 04-05 e 05-05 são significativamente diferentes dos obtidos nos dias 06-03, 29-05 e 26-06.

**Figura 22** – Contagem média de *Enterobacteriaceae* (log ufc/g) em amostras de peito de frango recolhidas em dias de abate diferentes (a, b – letras diferentes correspondem a médias significativamente diferentes para  $p<0,05$ )



Ao observar os níveis médios de contagem de *Enterobacteriaceae* obtidos em função dos produtores (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L), representados na Figura 23, verificou-se que o produtor G foi o que obteve contagem mais elevada (4,65 log ufc/g), enquanto que o produtor C foi o que apresentou menor nível de contagem (1,73 log ufc/g). Pela análise estatística efectuada não se observaram valores significativamente diferentes para as médias dos vários produtores ( $F=2,02$ ; Significância=0,15).

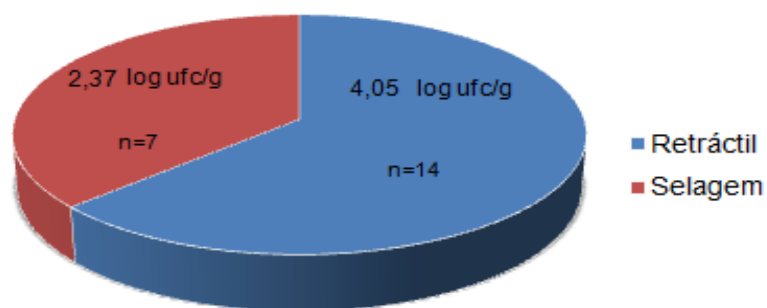
**Figura 23** – Contagens médias de *Enterobacteriaceae* (log ufc/g) em amostras de peito de frango em função do produtor



Quanto ao tipo de filme de embalagem (Figura 24) verificou-se que o teor médio de *Enterobacteriaceae* foi de 4,05 log ufc/g nas embalagens retráteis, enquanto que nas embalagens por selagem foi inferior (2,37 log ufc/g).

Comparando os valores médios de ambas as embalagens, constatou-se que existiam diferenças significativas ( $F=50,74$ ; Significância=0,000).

**Figura 24** – Contagem média de *Enterobacteriaceae* (log ufc/g) em amostras de peitos de frango acondicionados em diferentes tipos de filme de embalagem



#### 4.3. Avaliação da Higiene do Ambiente Fabril

No sentido de avaliar a higiene da sala de desmancha procedeu-se à contagem de *Enterobacteriaceae* (Tabela 4) verificando-se a existência de possíveis contaminações com *Campylobacter* spp. (pesquisa) e o nível dessa contaminação (contagem) nas diversas superfícies da sala de desmancha (n=21) (Tabela 5).

Analisando as contagens das amostras da mesa e tapete, constatou-se que estas apresentavam um teor de contaminação por *Enterobacteriaceae* inferior a 1 log ufc/cm<sup>2</sup> (limite de sensibilidade do método) encontrando-se assim num nível aceitável de higiene (Decisão CE 471/2001).

De salientar que, em virtude dos resultados obtidos nas superfícies de trabalho serem satisfatórios e constantes ao longo do tempo, considerou-se suficiente a realização de apenas três ensaios.

**Tabela 4** – Contagem de *Enterobacteriaceae* em superfícies da sala de desmancha, recolhidas em diferentes dias de trabalho

Dia de colheita	Local	Contagem
I	Mesa	<1 log ufc/cm <sup>2</sup>
	Tapete	<1 log ufc/cm <sup>2</sup>
II	Mesa	<1 log ufc/cm <sup>2</sup>
	Tapete	<1 log ufc/cm <sup>2</sup>
II	Mesa	<1 log ufc/cm <sup>2</sup>
	Tapete	<1 log ufc/cm <sup>2</sup>

Analisando a Tabela 5 referente aos resultados obtidos na pesquisa e contagem de *Campylobacter* spp., verificou-se que este agente não estava presente na superfície das amostras recolhidas: mesa, tapete, parede, lâmina de corte de asas e máquina de aparar peitos (inferior ao limite de sensibilidade). Pela pesquisa de *Campylobacter* spp. constatou-se que as superfícies não se encontravam contaminadas, uma vez que não se detectou a sua presença.

**Tabela 5** – Contagem e pesquisa de *Campylobacter* spp. em diferentes superfícies da sala de desmancha

Dia de colheita	Local	Contagem	Pesquisa
I	Mesa	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 625 cm <sup>2</sup>
	Tapete	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 625 cm <sup>2</sup>
	Parede	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 900 cm <sup>2</sup>
	Lâmina Corte de Asas	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 3000 cm <sup>2</sup>
	Lâmina Aparar Peitos	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 1316 cm <sup>2</sup>
II	Mesa	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 625 cm <sup>2</sup>
	Tapete	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 625 cm <sup>2</sup>
	Parede	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 900 cm <sup>2</sup>
	Lâmina Corte de Asas	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 3000 cm <sup>2</sup>
	Lâmina Aparar Peitos	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 1316 cm <sup>2</sup>
III	Mesa	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 625 cm <sup>2</sup>
	Tapete	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 625 cm <sup>2</sup>
	Parede	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 900 cm <sup>2</sup>
	Lâmina Corte de Asas	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 3000 cm <sup>2</sup>
	Lâmina Aparar Peitos	<0,7 log ufc/cm <sup>2</sup>	Ausente em 1316 cm <sup>2</sup>

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Após análise dos resultados obtidos verificou-se que as amostras de peito de frango embaladas em atmosfera protectora (n=21) e analisadas após 3 dias de armazenamento (0°C-4°C) apresentavam uma frequência de *Campylobacter* spp. de 100%, sendo este resultado superior aos descritos por outros autores (Salam, 2007, Fraqueza, 2009).

Num estudo realizado em Portugal, Fraqueza (2009) obteve uma frequência de 80 a 86% de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* em carcaças de frango de diferentes sistemas produtivos (biológico, extensivo e intensivo), tendo verificado que após a desmancha, 93% dos peitos provenientes destas carcaças se encontravam contaminados.

Franchin, Ogliari e Batista (2007), avaliaram a presença deste agente em 335 amostras de carcaças de frango num matadouro do Brasil, tendo obtido uma frequência de 69,4% após a evisceração e de 84,7% após a refrigeração.

De um total de 325 carcaças de frango de raça broiler, Son, Englen, Berrang, Fedorka-Cray e Harrison (2007) isolaram este agente enteropatogénico em 92% das carcaças recolhidas antes do escaldão. Nas carcaças obtidas antes da refrigeração constataram que a frequência de *Campylobacter* era superior, nomeadamente de 100%, sendo que o nível de contaminação diminuiu após a refrigeração das mesmas, tendo-se detectado a presença deste agente em 52% das amostras.

Salam (2007) num estudo feito no Japão, recolheu 45 amostras de peito de frango com pele, tendo obtido uma frequência de *Campylobacter* spp. de 64,4% (29 amostras).

Kozacinski, Hadziosmanovic e Zdolec (2006) realizaram um estudo na Croácia com uma amostragem de 21 peitos de frango sem pele, não tendo detectado a presença de *Campylobacter* spp. Por outro lado, Dufrenne, Ritmeester, Delfgou-van Asch, van Leusden & de Jonge (2001) realizaram um estudo na Holanda, no qual as amostras de peito de frango analisadas apenas apresentavam uma frequência para este enteropatogénico de 18%.

Dos trabalhos anteriormente descritos, observa-se que nas carcaças de frango e nas amostras de peito com pele a frequência de *Campylobacter* spp. é superior, uma vez que este agente consegue sobreviver nos folículos pilosos (Keener *et al.*, 2004). Quando os estudos foram efectuados em amostras de peito de frango sem pele, verificou-se um teor de contaminação por *Campylobacter* inferior, podendo esta condição ser justificada pelo facto de o músculo ser estéril, e a ocorrência de *Campylobacter* nestas amostras ser devida a contaminações cruzadas. Assim, é de estranhar que as amostras de peito de frango em estudo, que se encontravam numa atmosfera que não é favorável ao desenvolvimento e sobrevivência deste agente, ao final de três dias de refrigeração (0-4°C) se encontrem ainda com um teor de contaminação elevado (1,59 log ufc/g).

Relativamente à identificação das estirpes pela técnica de PCR *multiplex*, constatou-se que a espécie predominante foi *Campylobacter jejuni* (47%), estando *Campylobacter coli*



presente em 25% das amostras. Também foi detectada a presença simultânea de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em 19% das amostras. Estes dados são corroborados pelos obtidos por Fraqueza (2009), que em 56% das amostras analisadas identificou *Campylobacter jejuni* como sendo a espécie mais prevalente.

Estudos realizados por outros autores revelam igualmente que a espécie identificada com maior prevalência foi *Campylobacter jejuni*, no entanto o seu valor é superior ao verificado no presente trabalho experimental. Sallam (2007) detectou a presença de *Campylobacter jejuni* em 82,5% das amostras de peito de frango, sendo as restantes 17,5% identificadas como *Campylobacter coli*. Estes resultados são compatíveis com os obtidos por Gromley *et al.* (2008) e Jorgensen *et al.* (2002), que identificaram *Campylobacter jejuni* em 92,7% e 98% dos isolados e *Campylobacter coli* em apenas 7,3% e 2%, respectivamente.

De um total de 140 amostras de carcaças de frango (pescoço, cloaca, peito e dorso) recolhidas após a lavagem e antes da refrigeração num matadouro no Sul de Itália, Pepe *et al.* (2009), identificaram *Campylobacter jejuni* como sendo a espécie predominante (37,1%), não tendo sido isolado *Campylobacter coli* nas amostras em estudo.

Estas diferenças observadas a nível das frequências podem ser explicadas parcialmente pelas variações das temperaturas de armazenamento e sazonalidade, isto é amostras recolhidas em diferentes alturas do ano (EFSA, 2009a).

Comparando os resultados obtidos na técnica de PCR *multiplex* com os da prova do hipurato, verificou-se que o primeiro apresentava uma maior especificidade e sensibilidade para a detecção e confirmação deste agente enteropatogénico, uma vez que a prova do hipurato pode originar falsos negativos. Estes dados são corroborados por Nakari *et al.* (2008), que referem que das 152 estirpes identificadas, através da prova do hipurato, como *Campylobacter coli* (hipurato-negativas), 39% foram identificadas como *Campylobacter jejuni* através de PCR *multiplex*.

As amostras de peito de frango que obtiveram contagem de *Campylobacter* spp. neste trabalho experimental, apresentaram uma média de 1,59 log ufc/g, que foi inferior às reportadas noutros estudos já publicados. Gormley *et al.* (2008) obtiveram contagens médias de  $5,3 \times 10^4$  ufc/g (4,72 log ufc/g) em amostras de peito de frango sem pele, enquanto que Lubber e Bartlett (2008) obtiveram uma contagem de *Campylobacter* de  $1,9 \times 10^3$  ufc/g (3,28 log ufc/g) de amostra de peito de frango sem pele.

Relacionando o resultado das amostras de peito (1,59 log ufc/g) com a ausência de contagem e pesquisa de *Campylobacter* das amostras das superfícies da sala de desmancha após higienização (inferior a 0,7 log ufc/g, limite de sensibilidade do método), depreende-se que o teor de contaminação presente nas amostras de peito de frango se deve principalmente à ocorrência de contaminações cruzadas durante o abate das aves por contaminação fecal, posterior manipulação dos peitos e contaminação das superfícies de trabalho e não a falhas de higienização das mesmas. Posch *et al.* (2006) referem que a

contaminação das carcaças de frango ocorre ao longo de toda a linha de abate, devido ao contacto permanente das mesmas com o equipamento. Nauta *et al.* (2009) salientam que as etapas que potenciam o risco de contaminação das carcaças são o escaldão, a depena, a evisceração, a lavagem e o arrefecimento por imersão.

Ao observar os teores médios de *Campylobacter* nos diferentes dias de abate, constatou-se que existem diferenças significativas entre eles, sendo os dias 17-04, 29-05 e 26-06 os que apresentam menores teores médios de contaminação (0,33 log ufc/g e inferior a 0,7 log ufc/g, respectivamente). Estas diferenças poderão ser devidas ao manejo dos bandos até à chegada ao matadouro (estado sanitário dos animais, origem dos bandos, densidade populacional na exploração, vazio sanitário, limpeza e remoção de fezes e penas, alimentação e origem/fonte de água, lavagem e desinfecção das caixas de transporte e dos camiões) (Stern *et al.*, 2001). O período de jejum antes do transporte e a diminuição do stress nas aves durante o mesmo, são medidas fundamentais para minimizar a contaminação dos bandos, pois estas podem induzir uma menor excreção de *Campylobacter* spp. pelas fezes e consequentemente menor probabilidade de contaminação nas diferentes etapas de abate (Keener *et al.*, 2004). Slader *et al.* (2002), estudaram o efeito do transporte, na contaminação dos bandos por *Campylobacter* e concluíram que este aumenta significativamente ( $p < 0,001$ ) a probabilidade de contaminação final dos bandos. Jacobs-Reitsma (2000) refere que as potenciais fontes de contaminação deste agente em carcaças de aves são a contaminação fecal da pele e penas durante o transporte para a unidade de abate, bem como o contacto com outras carcaças e equipamento contaminado. As diferenças verificadas nos diversos dias de abate também poderão ser devidas à falta de reciclagem da água do escaldão, ao uso contínuo das dedeiras mecânicas das depenadoras e a condições de armazenamento inadequadas, assim como à manipulação dos peitos pelos funcionários na sala de desmancha (Stern & Robach, 2003). Segundo Herman *et al.* (2003), existe uma correlação significativa ( $p < 0,001$ ) entre a contaminação inicial da carcaça e a contaminação da mesma após o processamento, sendo esta superior nos bandos que apresentam níveis superiores de *Campylobacter*.

Constatou-se igualmente que a sequência da linha de abate poderá ter influência no teor de contaminação dos peitos de frango, uma vez que existe uma tendência para aumentar a contagem de *Campylobacter* da primeira amostra recolhida no primeiro bando abatido para a segunda (do segundo bando abatido). Uma medida para minimizar esta situação consiste na rastreabilidade dos bandos antes do abate, de modo a que os bandos negativos sejam abatidos antes dos positivos (Hansson *et al.*, 2005).

O relatório da FAO e WHO (2009), relativo à avaliação dos riscos microbiológicos por *Salmonella* e *Campylobacter* em carne de frango, refere que as contaminações cruzadas a nível da etapa de escaldão podem ser minimizadas, aumentando a temperatura do tanque até 70°C, reciclando a água e higienizando regularmente o mesmo. Na etapa de depena a

contaminação das carcaças pode ser reduzida através da mudança regular das dedeiras e utilização apropriada do equipamento, evitando a disseminação de penas e partículas pelo ambiente (Berrang & Dickens, 2000).

Ao avaliar a contaminação dos peitos de frango em função dos produtores, não se verificaram diferenças significativas nas contagens obtidas, pelo que se pode concluir que a sua origem não influenciou o teor final de *Campylobacter*.

O tipo de filme da embalagem utilizado (retráctil e por selagem) também não influenciou a contaminação dos peitos, uma vez que não se detectaram diferenças significativas entre eles. No entanto face às contagens elevadas de *Campylobacter* spp. nas amostras em estudo, considera-se que haveria necessidade de analisar as amostras de peito de frango antes do embalamento, de modo a comparar o efeito que este processo teria no teor de contaminação por este agente em peitos embalados e não embalados.

Analisando individualmente o teor de contaminação de cada peito, constatou-se que o peito proveniente do bando 2, é o que tem maior potencial de causar doença no homem, uma vez que este apresenta uma contagem de *Campylobacter* de 2,9 log ufc/g, sendo assim superior à dose infectante documentada por Sallam (2007) e Janssen *et al.* (2008), isto é de 500 ufc ou 2,70 log ufc.

Para avaliar a higiene do processo nas amostras de peito de frango procedeu-se à contagem de *Enterobacteriaceae*, tendo-se obtido um teor médio de contaminação de 3,49 log ufc/g. Como o Regulamento CE 1441/2007, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, não contempla os limites aceitáveis deste microrganismo em carne de frango e como a Decisão CE 471/2001, apenas se refere aos níveis de *Enterobacteriaceae* em superfícies, é necessário comparar os resultados obtidos neste trabalho com estudos já publicados. Assim, verificou-se que a contagem média obtida neste estudo foi ligeiramente superior à descrita por Capita, Alonso-Calleja, Garcia-Arias, Moreno, Garcia-Fernandez (2002). Estes autores avaliaram os teores de contaminação de *Enterobacteriaceae* em carcaças de Frango, em Espanha, tendo obtido 3,04 log ufc/g. Kozacinski *et al.* (2006), obtiveram uma contagem média de *Enterobacteriaceae* de 3,62±0,48 log ufc/g em peitos de frango sem pele.

Por outro lado, Göksoy, Kirkan & KöK (2004), obtiveram teores de *Enterobacteriaceae* superiores em amostras de pele de pescoço recolhidas, após a refrigeração, em dois matadouros diferentes, tendo obtido 3,81 log ufc/g e 3,91 log ufc/g.

Em função dos dias de abate verificaram-se diferenças significativas nos teores de *Enterobacteriaceae*, sendo estas menores nos dias 06-03, 29-05 e 26-06. As *Enterobacteriaceae* funcionam como um indicador da higiene dos processos a nível do matadouro, bem como indicador da presença de outros agentes patogénicos (Martins & Germano, 2007), e como nestes dias se verificaram menores teores de contaminação, depreende-se que os procedimentos na linha de abate se realizaram de forma mais

higiénica e efectiva em relação à prevenção da contaminação fecal. Provavelmente, as acções de higienização a nível do matadouro foram também feitas de forma mais efectiva.

De realçar que, a contaminação das amostras de peito de frango ocorreu provavelmente e principalmente ao longo da linha de abate e não foi devida ao contacto com as superfícies de trabalho da sala de desmancha, uma vez que estas apresentaram níveis aceitáveis de higiene (inferior a 1 log ufc/g).

Após análise dos resultados obtidos em função do produtor, constatou-se que não existiam diferenças significativas, o que reforça a hipótese de a contaminação verificada nos peitos de frango se dever às diferentes etapas do abate, nomeadamente escaldão, depena, evisceração, lavagem e arrefecimento.

Quanto ao tipo de embalagem utilizado, constatou-se que existem diferenças significativas entre as embalagens por selagem e as retrácteis, sendo o teor de *Enterobacteriaceae* superior neste último tipo de embalagem (4,05 log ufc/g). Esta discrepância pode ser atribuída ao processo de embalagem, bem como às propriedades dos filmes utilizados, o filme retráctil caracterizou-se por uma maior permeabilidade ao oxigénio, dióxido de carbono e vapor de água, o que poderá alterar as proporções da mistura de gases utilizada mais rapidamente, influenciando o desenvolvimento de *Enterobacteriaceae*. Aksu, Karaoglu, Kaya, Esenbuga & Macit (2005), estudaram o efeito do tipo embalagem sobre os teores de contaminação por *Enterobacteriaceae* em peitos de frango, armazenados a 3°C, ao longo de 12 dias. As amostras foram embaladas a vácuo e em embalagem com uma atmosfera rica em oxigénio, tendo sido analisadas ao final de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 dias de armazenamento. Estes autores verificaram que as embalagens com atmosferas ricas em oxigénio influenciavam significativamente ( $p < 0,01$ ) o teor de *Enterobacteriaceae* ao longo do período de armazenamento.

De salientar que pela observação dos valores indicadores de higiene do processo, não se consegue estabelecer qualquer relação com o nível de contaminação por *Campylobacter* nas amostras de peito de frango.

## 6. CONCLUSÃO

A realização deste estudo decorreu durante um período de seis meses e permitiu avaliar a frequência e nível de contaminação de *Campylobacter* spp. em peitos de frango, bem como em superfícies de contacto directo e indirecto da sala de desmancha, depois da sua higienização. Foi igualmente avaliado o nível de higiene do processo nestas amostras, através da contagem de *Enterobacteriaceae*.

Após a pesquisa e contagem de *Campylobacter*, verificou-se que todas as amostras de peito de frango se encontravam contaminadas (100%), sendo o teor médio encontrado em 13 das 21 amostras analisadas, de 1,59 log ufc/g.

Através da técnica PCR *multiplex*, foi possível identificar *Campylobacter jejuni*, como sendo a espécie predominante (47%).

Nas superfícies do ambiente fabril (mesa, tapete, parede, lâmina de corte de asas e lâmina de aparar peitos) não foi detectada a presença deste agente patogénico, concluindo-se que estas não tiveram influência no teor de contaminação final dos peitos. Esta foi provavelmente devida a uma contaminação cruzada ao longo da linha de abate, manipulação e embalamento.

*Campylobacter* é um indicador de segurança microbiológica dos peitos de frango. Este patogénico presente, tal como constatado, nas amostras de peito de frango representa um potencial perigo para o consumidor, uma vez que pode contaminar outros alimentos por contaminação cruzada, nomeadamente alimentos prontos a comer (vegetais, frutas e alimentos já processados que não necessitem de cozedura), bem como através da preparação e ingestão de carne de frango mal cozinhada.

Após a contagem de *Enterobacteriaceae* nos peitos de frango e nas superfícies da sala de desmancha (mesa e tapete), constatou-se que os processos de abate e desmancha das carcaças apresentam um nível higiosanitário aceitável. Pela observação dos valores indicadores de higiene do processo, não se consegue estabelecer qualquer relação com o nível de contaminação por *Campylobacter* nas amostras de peito de frango.

Considerando que em Portugal não existem dados oficiais sobre esta zoonose, e que a informação existente não se encontra centralizada, é importante a criação de uma base de dados e de um sistema de vigilância e de notificação, que permita uma análise de risco quantitativa, de modo a conhecer o impacto e a incidência desta doença no homem. Urge assim a necessidade de estabelecer políticas de segurança alimentar eficazes, que possibilitem a harmonização e comparação dos dados existentes em todos os Estados Membros.

Face ao constatado deverão ser introduzidas intervenções para controlo de *Campylobacter* spp. ao longo de toda a cadeia alimentar, nomeadamente a nível da produção, linha de abate e distribuição, bem como fomentar a formação dos operadores e consumidores no

sentido de melhorar a segurança microbiológica destes produtos e consequentemente minimizar o risco de infecção para o consumidor.

## BIBLIOGRAFIA

- Adkin, A., Harnett, E., Jordan, L., Newell, D. & Davison, H. (2006). Use of systematic review to assist the development of *Campylobacter* control strategies in Broilers. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 306-315.
- Aksu, M. I., Karaoglu, M., Kaya, M., Esenbuga, N. & Macit, M. (2005). Effect of dietary humate on pH, TBARS, and microbiological properties of vacuum and aerobic-packed breast and drumstick meats of broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (9), 1485-1491.
- Al-Shamahy, H.A., Al-Robasi, A. & Al-Moyed, K.A. (2007). Epidemiology, clinical features and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* infections in Sana'a, Yemen. *Journal of Chinese Clinical Medicine*, 2 (8), 455-463.
- Altekruse, S.F. & Tollefson, L.K. (2003). Human campylobacteriosis: a challenge for the veterinary profession. *Journal of the American Veterinary Association*, 223 (4), 445-452.
- Alter, T., Gaull, F., Kasimir, S., Gurtler, M., Mielke, H. & Linnebur, M. (2005). Prevalences and transmission routes of *Campylobacter* spp. strains within multiple pig farms. *Veterinary Microbiology*, 108, 251-261.
- Amri, A., Senok, A., Ismaeel, A., Al-Mahmeed, A. & Botta, G. (2007). Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 1350-1355.
- Ang, C., Laman, J., Willison, H., Wagner, E., Endtz, H., De Klerk, M., Tio-Gillen, A., Van Den Braack, N., Jacobs, B. & Doorn, P. (2002). Structure of *Campylobacter jejuni* lipopolysaccharide determines antiganglioside specificity and clinical features of Guillain-Barre and Miller Fisher Patients. *Infection and Immunity*, 70 (3), 1202-1208.
- Anónimo (2005a). Perspectivas globais para os mercados de carne de aves. *Aves e Ovos*, 181, 18-24.
- Anónimo (2005b). Animal disease factsheets. *The Center for Food Protection Security & Public Health*, 1-5.
- AVEC (2009). Annual Report: Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU Countries. Acedido em Nov. 27, 2009, disponível em: [www.avec-poultry.eu](http://www.avec-poultry.eu).
- Bailey, G.D., Vanselow, B.A., Hornitzky, M.A., Hum, S.I., Eamens, G.J. & Gill, P.A. (2003). A study of foodborne pathogens: *Campylobacter*, *Listeria*, *Yersinia*, in faeces from slaughter-age cattle and sheep in Australia. *Communicable Diseases Intelligence*, 27, 249-257.
- Bang, D.D., Scheutz, F., Ahrens, P., Pedersen, K., Blom, J. & Madsen, M. (2001). Prevalence of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolate from Danish broilers. *Journal of Medical Microbiology*, 50, 1087-1094.
- Barbut, S. (2002). Poultry meat processing and product technology. In Barbut S., *Poultry products processing: an industry guide*. USA, CRC Press.

- Baré, J., Sabbe, K., Wichelen, J.V., van Gremberghe, I., D'hondt, S. & Houf, K. (2009). Diversity and habitat specificity of free-living protozoa in commercial poultry houses. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (5), 1417-1426.
- Beach, J.C., Murano, E.A. & Acuff, G.R., Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter. *Journal of Food Protection*, 65, 1687-1693.
- Berrang, M.E. & Dickens, J.A. (2000). Presence and level of *Campylobacter* spp. on broiler carcasses throughout the processing plant. *Journal of Applied Poultry Research*, 9, 43-47.
- Berrang, M.E., Smith, D.P., Windham, W.R. & Feldner, P.W. (2004). Effect of intestinal content contamination on broiler carcass *Campylobacter* counts. *Journal of Food Protection*, 67, 235-238.
- Bhavsar, S. & Kapadnis, B. (2007). *Virulence factors of Campylobacter*. The Internet Journal of Microbiology, 3. Acedido em Jan. 26, 2009, disponível em: <http://www.ispub.com>
- Black, A., Kirk, M. & Millard, G. (2006). *Campylobacter* outbreak due to chicken consumption at an Australian Capital Territory restaurant. *Communicable Diseases Intelligence*, 30, 373-377.
- Botteldoorn, N., Van Coillie, E., Piessens, V., Rasschaert, G., Debruyne, L., Heyndrickx, M., Herman, L. & Messens, W. (2008). Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1909-1918.
- Boxall, N. (2005). *The Epidemiology of Campylobacter jejuni in Commercial Broiler Flocks in New Zealand*. Doctoral Thesis. New Zealand: Massey University.
- Boysen, L. Knøchel, S. & Rosenquist, H. (2007). Survival of *Campylobacter jejuni* in different gas mixtures. *FEMS Microbiology Letters*, 266 (2), 152-157.
- Bull, S.A., Allen, V.M., Domingue, G., Jorgensen, F., Frost, J.A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D., Corry, J.E.L., Gillard-King, J. & Humphrey, T.J. (2006). Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (1), 645-652.
- Byrd, J.A., Hargis, B.M & Cadwell, D.J. (2001). Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of broiler. *Poultry Science*, 80, 278-283.
- Cabrita, J., Rodrigues, J., Bragança, F., Morgado, C., Pires, I. & Penha Gonçalves, A. (1992). Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from wild and domestic animals from Northeast Portugal. *Journal of Applied Microbiology*, 73, 279-285.
- Callicott, K. A., Haoardóttir, H., Georgsson, F., Reiersen, J., Frioriksdóttir, V., Gunnarsson, E., Michel, P., Bisailon, J. R., Kristinsson, K. G., Briem, P., Hiatt, K. L., Needleman, D. S. & Stern, N. J. (2008). Broiler *Campylobacter* contamination and human campylobacteriosis in Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (21), 6483-6494.
- Calistri, P. & Giovannini, A. (2008). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis related to the consumption of chicken meat in two Italian regions. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 274-287.



- Capita, R., Allonso-Calleja, C., Garcia-Arias, M. T., Moreno, B. & Garcia-Fernandez, M. (2002). Methods to detect the occurrence of various indicator bacteria on the surface of retail poultry in Spain. *Journal of Food Science*, 67, 765-771.
- Carvalho, A., Lima, V., Pereira, G. & Schocken-Iturrino, R. (2001). *Campylobacter* em Granja Avícola. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 96, 191-195.
- Centre for Food Security & Public Health (CFSPH) (2005). *Animal Disease Factsheets*. Acedido em Out. 16, 2009, disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu>.
- Cepero, R. (2002). Producción de carne de pollo. *Real Escuela de Avicultura*, 19, 445-497.
- Chantarapanont, W., Berrang, M. & Frank J. F. (2003). Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin. *Journal of Food Protection*, 66, 2222 – 2230.
- Colles, F.M., Jones, T.A., MacCarthy, N.D., Sheppard, S.K., Cody, A.J., Dingle, K.E., Dawkins, M.S. & Maiden, M.C.J. (2008). *Campylobacter* infection of broiler chickens in a free-range environment. *Environmental Microbiology*, 10 (8), 2042-2050.
- Cools, I., Uyttendaele, M., Caro, C., D’Haese, E., Nelis, H.J. & Debevere, J. (2003). Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 886-892.
- Corry, J., Atabay, H., Forsythe, S. & Mansfield, L. (2003). Culture media for the isolation of *Campylobacters*, *Helicobacters* and *Arcobacters*. In J. Corry, G. Curts & R. Baird, *Handbook of Culture Media for Food Microbiology* (pp.271-316). Amsterdam: Elsevier.
- Costa, P.M. (2008). Biossegurança em explorações pecuárias: a perspectiva avícola. *Ordem dos Médicos Veterinários*, 50, 26-31.
- Cox, J.M. & Pavic A. (2009). Advances in enteropathogen control in poultry production. *Journal of Applied Microbiology*, 1-11.
- Damborg, P., Olsen, K.E.P., Nielson, E.M. & Guardabassi, L. (2004). Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 1363-1364.
- Davis, M. A. & Conner, D. E. (2007). Survival of *Campylobacter jejuni* on poultry skin and meat at varying temperatures. *Poultry Science Association Inc.*, 86, 765 – 767.
- Decisão da Comissão 2001/471/CE. *Decisão da Comissão, de 8 de Junho de 2001, que estabelece regras para os controlos regulares à higiene geral efectuados pelos operadores aos estabelecimentos de acordo com a Directiva 64/433/CEE relativa às condições de produção e de colocação de carnes frescas no mercado e com a Directiva 71/118/CEE relativa a problemas sanitários em matéria de comércio de carnes frescas de aves de capoeira*. Comissão Europeia. Bruxelas.
- Decisão da Comissão 2007/516/CE. *Decisão da Comissão, de 19 de Julho de 2007, relativa a uma participação financeira da Comunidade para a realização, nos Estados-Membros, de um estudo sobre a prevalência e a resistência antimicrobiana de Campylobacter spp. em bandos de frangos e sobre a prevalência de Campylobacter spp. e de Salmonella spp. em carcaças de frango*. Comissão Europeia. Bruxelas.

- Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel G., Blivet, D., Salvat, G. & Colin, P. (1999). Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 406- 410.
- Dingle, K.E., Van Den, B.N & Colles, F.M (2001). Sequence typing confirms that *Campylobacter jejuni* strains associated with Guillan-Barré and Miller-Fisher syndromes are of diverse genetic lineage, serotype and flagella type. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3346-3349.
- Direcção Geral de Saúde (2004). *Plano Nacional de Saúde 2004-2010. Volume II - Orientações Estratégicas*. Acedido em Dez. 11, 2009, disponível em: <http://www.acs.min-saude.pt/wp-content/uploads/2008/07/pnsvii.pdf>.
- Direcção Geral de Saúde (2007). *Doenças de Declaração Obrigatória 2002-2006*. Acedido em Nov. 25, 2009, disponível em: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/I008987.pdf>.
- Direcção Geral de Veterinária (DGV) (2009). *Carne de aves*. Acedido em Nov. 27, 2009, disponível em: [http://portal.min-agricultura.pt/portal/page/portal/MADRP/PT/gripe\\_das\\_aves/recom\\_tecn\\_plan\\_vigilanc/folhetos/COMSUMCARNEAVES.pdf](http://portal.min-agricultura.pt/portal/page/portal/MADRP/PT/gripe_das_aves/recom_tecn_plan_vigilanc/folhetos/COMSUMCARNEAVES.pdf).
- Direcção Geral de Veterinária (DGV) (2005). Biossegurança nas explorações avícolas. *Aves e Ovos*, 181, 28-31.
- Directiva 2003/99/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. *Relativa à vigilância das zoonoses e dos agentes zoonóticos, que altera a Decisão 90/424/CEE e revoga a Directiva 92/117/CEE*. Comissão Europeia. Bruxelas.
- Donnison, A. (2003). *Isolation of Thermotolerant Campylobacter – Review & Methods for New Zealand Laboratories*. Acedido em Jan. 26, 2009, disponível em: <http://moh.govt.nz/moh.nsf/pagesmh/2588?Open>.
- Dufrenne, J. Ritmeester, W., Delfgou-van Asch, E., van Leusden, F. & de Jonge, R. (2001). Quantification of the contamination of chicken and chicken products in The Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. *Journal of Food Protection*, 64, 538-541.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2009). *Annual epidemiological report on communicable diseases 2009*. Acedido em Nov. 25, 2009, disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/>.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2005). *Scientific Report of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to Campylobacter in animals and foodstuffs*. Acedido em Mai. 30, 2009, disponível em: <http://www.efsa.eu.int>.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2009a). Community Summary Report: Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal* 2009, 223, 109-133.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2009b). *Press Releases & News Stories: EFSA-ECDC reports shows Campylobacter cases in humans on the rise, while salmonellosis is decline; listeriosis remains of concern*. Acedido em Nov. 15, 2009, disponível em: [http://www.efsa.eu/EFSA/efsa\\_locale.1178620753812\\_1211902267941.html](http://www.efsa.eu/EFSA/efsa_locale.1178620753812_1211902267941.html).

- European Food Safety Authority (EFSA) (2009c). Scientific Report of EFSA: Report on the availability of molecular typing methods for *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* isolates from food, animals and feedingstuffs in European Union Member States (and in some other reporting countries). *The EFSA Journal*, 272, 1-52.
- Ellis-Iversen, J.; Pritchard, G.; Wooldridge, M. & Nielsen, M. (2009). Risk Factors for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in young cattle on English and Welsh farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 88, 42-48.
- Euroteste (2008). *Consumo de Carne em Portugal – Conclusões do estudo Euroteste*. Acedido em Nov. 28, 2009, disponível em: <http://www.office-elevage.fr/presentation-port/guide/chap-03.pdf>.
- Euzéby, J. P. (2009). List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Campylobacter*. Acedido em Out. 19, 2009, disponível em: [http://www. Bacterio.net](http://www.Bacterio.net).
- Evans, S.J., & Sayers A.R. (2000). A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broilers flocks in Great Britain. *Preventive Veterinary Medicine*, 46 (3), 209-223.
- Evans, S.J., Ribeiro, C.D. & Salomon, R.L. (2003). Hazards of Healthy living: Bottled water and salad vegetables as risk factors for *Campylobacter* infection. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 1219-1225.
- FAO (Food and Agriculture Organization) & WHO (World Health Organization). (2009). Microbiological risk assessment series. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: meeting report. Acedido em Dez. 11, 2009, disponível em: <ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jemra/MRA1911Nov09.pdf>
- Fenwick, S.G., West, D.M., Hunter, J.E.B., Sargison, N.D., Ahmed, F. & Lumsden, J.S. (2000). *Campylobacter fetus fetus* abortions in vaccinated ewes. *New Zealand Veterinary Journal*, 48, 155-157.
- Fernandes, M., Mena, C., Silva, J. & Teixeira, P. (2009). *Study of Cytolethal Distending Toxin (cdt) in Campylobacter coli Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay and its Distribution Among Clinical and Food Strains*. Acedido em Nov. 28, 2009, disponível em: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/fpd.2009.0326>.
- Fraqueza, M.J. (2009). *Ocorrência de Campylobacter em Portugal: contribuição para a caracterização de um perigo emergente em segurança alimentar* [versão electrónica]. In Resumos do III Ciclo de Conferências de Saúde Pública Veterinária: Saúde Animal e Saúde Humana, Uma Única Saúde, Porto, 3-4 de Julho. Acedido em Dez, 07, 2009, em [http://www.skyros-congressos.com/images/congressos/foto2/cartaz\\_SPV.pdf](http://www.skyros-congressos.com/images/congressos/foto2/cartaz_SPV.pdf).
- Franchin, P.R., Ogliari, P.J. & Batista, C.R.V. (2007). Frequency of Thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. *British Poultry Science*, 48 (2), 127-132.
- Friedman, C.R., Neimann, J., Wegener, H.C. & Tauxe, R.V., (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nation. In: Nachamkin, I. & Blaser, M.J. (Eds.). *Campylobacter* (2<sup>nd</sup> edition). Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press.
- Friis, L.M., Pin, C., Pearson, B.M. & Wells, J.M. (2005). In vitro cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *Journal of Microbiological Methods*, 61, 145-160.

- Fry, B.N., Feng, S., Chen, Y.Y., Diane, G.N., Peter, J.C. & Victoria, K. (2000). The *galE* gene of *Campylobacter jejuni* is involved in lipopolysaccharide synthesis and virulence. *Infection and Immunity*, 68, 2594-3601.
- Gellynck, X., Messens, W., Halet, D., Grijspeerdt, K., Hartnett, E., & Viaene, J. (2008). Economics of reducing *Campylobacter* at different levels within the Belgian poultry meat chain. *Journal of Food Protection*, 71, 479-485.
- Georgsson, F., Porkelsson, A.E., Geirsdottir, M., Reiersen, J. & Stern, N.J. (2006). The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiology*, 23, 677-683.
- Gillespie, I.A., O'Brien, S.J., Frost, J.A., Adak, G.K., Horby, P., Swan, A.V., Painter, M.J. & Neal, K.R. (2002). A Case –Case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: A tool for generating hypotheses. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), 937-942.
- Göksoy, E., Kirkan, S. & KöK, F. (2004). Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in Turkey. *Poultry Science*, 83, 1427-1432.
- Gondo, T., Sekizuka, t., Manaka, N., Murayama, O., Millar, B.C., Moore, J.E. & Matsuda, M. (2006). Demonstration of the shorter flagellin (*flaA*) gene of urease-positive thermophilic *Campylobacter* isolated from the natural environment in Northern Ireland. *Folia Microbiology*, 51, 183-190.
- Gormley, F.J., MacRae, M., Forbes, K.J., Odgen, I.D., Dallas, J.F. & Strachan, N.J.C. (2008). Has retail chicken played a role in the decline of human campylobacteriosis? *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (2), 383-390.
- GPP (Gabinete de Planeamento e Políticas). (2008). *Anuário Pecuário 2006-2007*. Acedido em Out. 20, 2009, disponível em: [http://www.gppaa.min-agricultura.pt/pbl/period/Anuario\\_Pec\\_2006-07](http://www.gppaa.min-agricultura.pt/pbl/period/Anuario_Pec_2006-07).
- Guévremont, E., Higgins, R. & Quessy, S. (2004). Characterization of *Campylobacter* isolates recovered from clinically healthy pigs and from sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *Journal of Food Protection* 67, 228–234.
- Gunther, N. & Chen, C. (2009). The biofilm forming potencial of bacterial species in the genus *Campylobacter*. *Food Microbiology*, 26, 44-51.
- Hald, B., Pedersen, K., Wain, M., Jorgensen, J.C. & Madsen, M. (2004). Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 2003-2012.
- Hannis, J.C., Manalili, S.M., Hall, T.A., Ranken, R., White, N., Sampath, R., Blyn, L.B., Ecker, D., Mandrell, R.E., Fagerquist, C., Bates, A.H., Miller, W.G. & Hofstadler, S.A., (2008). High-resolution genotyping of *Campylobacter* species by use of PCR and high-throughput mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (4), 1220-1225.
- Hansson, I., Ederoth, M., Andersson, L., Vagsholm, I. & Olson, E. (2005). Transmission of *Campylobacter* spp. to chickens during transport to slaughter. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1149-1157.

- Hansson, I. (2007). *Bacteriological and epidemiological studies of Campylobacter spp. In Swedish Broilers*. Doctoral Thesis. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- Hansson, I. Vagsholm, I., Svensson, L. & Engvall, E.O. (2007). Correlations between *Campylobacter* spp. prevalence in the environment and broiler flocks. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 640-649.
- Hassane, D., Lee, R., Mendenhall, M. & Pickett, C. (2001). Cytolethal distending toxin demonstrates genotoxic activity in a yeast model. *Infection and Immunity*, 69, 5752-5759.
- Heres, L., Engel, B. Urlings, H.A.P., Wagenaar, J.A. & van Knapen, F. (2004). Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. *Veterinary Microbiology*, 99, 259-267.
- Herman, L., Heyndrickx, M., Grijspeerdt, K., Vandekerckhove, D., Rollier, I. & De Zutter, L. (2003) Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection*, 131, 1169–1180.
- Heuvelink, A.E., Valkenburgh, S.M., Tilburg, J.J. Van Heerwaarden, C., Zwartkruis-Nahuis, J.T. & De Boer, E. (2007). Public farms: hygiene and zoonotic agents. *Epidemiology and Infection*, 1174-1183.
- Hiett, K.L., Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Cox, N.A., Musgrove, M.T., & Ladely, S. (2002). Molecular subtype analyses of *Campylobacter* spp. from Arkansas and California poultry operations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6220-6236.
- Hickey, T.E., McVeigh, A.L., Scott, D.A., Michielutti, R.E., Bixby, A., Carroll, S.A., Bourgeois, A.L. & Guerry, P. (2000). *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cell. *Infection and Immunology*, 68, 6535-6541.
- Hong, J., Jung, W. K., Kim, J. M., Kim, S. H., Koo, H. C., Ser, J. & Park, Y. H. (2007). Quantification and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw chicken meats using a real-time PCR method. *Journal of Food Protection*, 70, 2015-2022.
- Horrocks, S. M., Anderson, R. C., Nisbet, D. J. & Ricke, S. C., (2008). Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals. *Anaerobe* xxx, 1-8.
- Hu, L. & Kopecko, D.J. (2000). Interactions of *Campylobacter* with eukaryotic cells: gut luminal colonization and mucosal invasion mechanisms. In I. Nachamkin & M.J. Blaser(ed.), *Campylobacter* (2<sup>nd</sup> edition). Washington: ASM Press.
- Hu, L. & Kopecko, D.J. (2003). *Campylobacter* species. In M. D. Miliotis & J. W. Bier (Eds.), *International Handbook of Foodborne Pathogens* (pp.181-198). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Humphrey, T.J., O'Brien, S. & Madsen, M. (2007). *Campylobacter* as a zoonotic pathogens: a food production perspective. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 237-257.
- Instituto Nacional de Estatística (INE). *Boletim Nacional de Agricultura e Pescas: Novembro 2009*. Acedido em Nov. 28, 2009, disponível em: [www.ine.pt](http://www.ine.pt).

- International Standard ISO/FDIS 10272 – 1 (2005). *Microbiology of Food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of Campylobacter spp. Part 1: Detection method*. International Standard Organization. Geneva.
- International Standard ISO/TS 10272 – 2 (2006). *Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de Campylobacter spp. Partie 2: Technique par comptage des colonies*. International Standard Organization. Geneva.
- International Standard ISO 18593 (2004). *Microbiology of Food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*. International Standard Organization. Geneva.
- Jacobs-Rietsma, W. (2000). *Campylobacter* in the food supply. In: Nachamkin, I. & Blaser, M. J. (Eds). *Campylobacter* (2<sup>nd</sup> edition). Washington, D. C.: ASM Press.
- Jensen, A.N., Dalsgaard, A., Baggesen, D.L. & Nielsen, E.M (2006). The occurrence and characterization of *Campylobacter jejuni* and *coli* in organic pigs and their outdoor environment. *Veterinary Microbiology*, 116, 96-105.
- Janssen, R., Krogfelt, K.A., Cawthraw, S.A., Van Pelt, W., Wagenaar, J. A. & Owen, R.J. (2008). Host-Pathogen Interactions in *Campylobacter* Infections: The Host Perspective. *Clinical Microbiology Reviews*, 21 (3), 505-518.
- Jore, S., Viljugrein, H., Brun, E., Heier, B.T., Borck, B., Ethelberg, S., Hakkinen, M., Kuusi, M., Reiersen, J., Hansson, I., Engvall, E.O., Lofdahl, M., Wagenaar, J.A., Pelt, W. & Hofshagen, M. (2009). Trends in *Campylobacter* incidence in Broilers and humans in six European countries, 1997-2007. *Preventive Veterinary Medicine*, 1-9.
- Jorgensen, F. Bailey, R. Williams, S., Henderson, P., Wareing, D. R. A., Bolton, F. J., Frost, J. A., Ward, I. & Humphrey, T. J. (2002). Prevalence and numbers of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on raw, whole chickens in relation to sampling methods. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 151-164.
- Kalmokoff, M., Lanthier, P., Tremblay, T.L., Foss, M., Lau, P.C., Sanders, G., Austin, J. & Kelly, J. (2006). Proteomic analysis of *Campylobacter jejuni* 11168 biofilms reveals a role for the motility complex in biofilm formation. *The Journal of Bacteriology*, 188, 4312-4320.
- Kapperud, G., Espeland, g., Wahl, E., Walde, A., Herikstad, H., Gustavsen, S., Tveit, I., Natas, O., Bevanger, L. & Digranes, A. (2003). Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infections: A prospective case-control study in Norway. *American Journal of Epidemiology*, 158, 234-242.
- Kawasaki, S., Fratamico, P. M., Wesley, I. V. & Kawamoto, S. (2008). Species-specific identification of *Campylobacters* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism and PCR targeting of the Gyrage B gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (8), 2529-2533.
- Keener, K., Bashor, M., Curtis, P., Sheldon, B. & Kathariou, S. (2004). Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 105-116.
- Kemp, R., Leatherbarrow, A.J., Williams, N.J., Hart, C.A., Clough, H.E., Turner, J., Wright, E.J., & French, N.P. (2005). Prevalence and genetic diversity of *Campylobacter* spp. in environmental water samples from a 100-square-kilometer predominantly dairy farming area. *Applied of Environmental Microbiology*, 71 (4), 1876-1882.

- Keum-II, J., Kim, M., Ha, S., Kim, K., Lee, K., Chung, D., Kim, C., Kim, K. (2007). Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 202-206.
- Klena, J., Parker, C., Knibb, K., Ibbitt, J., Devane, P., Horn, S., Miller, W. & Konkel, M. (2004). Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis* by a multiplex PCR developed from the nucleotide sequence of the lipid A gene *lpxA*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (12), 5549-5557.
- Konkel M., Monteville, M., Rivera-Amill, V. & Joens, L. (2001). The Pathogenesis of *Campylobacter jejuni* – Mediated Enteritis. *Microbiology*, 2, 55-71.
- Kozacinski, L., Hadziosmanovic, M. & Zdolec, N. (2006). Microbiological quality of poultry meat on the Croatian market. *Veterinarski Arhiv*, 74 (4), 305-313.
- Kuana, S. L., Santos, L. R., Rodrigues, L. B., Borsoi, A., Kellermann, A., Salle, C. T., Moraes, H. & Nascimento, V. P. (2008). Pré-enriquecimento e isolamento directo para identificação de *Campylobacter* em *swabs* cloacais e carcaças de frango. *Acta Scientiae Veterinarie*, 36(1), 21 – 24.
- Kuana, S. L., Santos, L. R. Rodrigues, L. B. & Nascimento, V. P. (2009). Sistema API CAMPY para caracterização de amostras de *Campylobacter* isoladas de descarga cecal, fezes, *swabs* cloacais e carcaças de frangos de corte. *Arquivos do Instituto Biológico*, 76 (2), 273 – 277.
- Kudirkiene, E., Malakauskas, A., Serniene, L. & Malakauskas, M. (2008). Isolation and identification of thermophilic *Campylobacter* spp. by PCR-RFLP in broilers flocks. *Veterinarija Ir Zootechnika*, 42 (64), 44-47.
- Lara-Tajero, M. & Galan, J.E. (2001). *CdtA*, *CdtB* and *CdtC* form a tripartite complex that is required for cytolethal distending activity. *Infection and Immunity*, 69, 4358-4365.
- Levin, R (2007). *Campylobacter jejuni*: A review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnology*, 21, 271-347.
- Line, J.E. (2001). *Campylobacter* and *Salmonella* levels for poultry raised on litter. *Journal of Poultry Science*, 81 (10), 1473-1481.
- Liu, G., Han, Y., Li, X. & Song, S. (2006). Applicability of a rapid method based on immunomagnetic capture-fluorescent PCR assay for *Campylobacter jejuni*. *Food Control*, 17, 527-535.
- Luber, P. & Bartlet, E. (2007). Enumeration of *Campylobacter* spp. on the surface and within chicken breast fillets. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 313-318.
- Lund, M., Nordentoft, S., Pedersen, K. & Madsen, M. (2004). Detection of *Campylobacter* spp. in chicken fecal samples by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (11), 5125-5132.
- Martin, K. W., Mattick, K. L. Harrison, M. & Humphrey, T. J. (2002). Evaluation of selective media for *Campylobacter* isolation. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 124 – 129.
- Martins, E. A. & Germano, P. M. L. (2007). Microbiological indicators for the assessment of performance in the hazard analysis and critical control points (HACCP) system in meat lasagne production. *Food Control*, 19, 764-771.

- McDowell, S.W., Menzies, F.D., McBride, S.H., Oza, A.N., McKenna, J.P., Gordon, A.W. & Neill, S.D. (2008). *Campylobacter* spp. in conventional broiler flocks in Northern Ireland: epidemiology and risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 84, 261-276.
- Meade, G.C. (2004). Meat quality and consumer requirements. In Mead, G.C. (Ed.), *Poultry meat processing and quality*. England: Woodhead Publishing Limited.
- Meldrum, R. J. & Ribeiro, C.D. (2003). *Campylobacter* in ready-to-eat foods: The result of a 15 month survey. *Journal of Food Protection*, 66 (11), 2135-2137.
- Meldrum, R.J., Tucker, I.D., Smith, R.M. & Edwards, C. (2005). Survey of *Salmonella* and *Campylobacter* contamination of whole, raw poultry on retail sale in Wales in 2003. *Journal of Food Protection*, 68, 1447-1449.
- Mena, C., Rodrigues, D.; Silva, J.; Gibbs, P. & Teixeira, P. (2008). Occurrence, identification and characterization of *Campylobacter* species isolated from portuguese poultry samples collected from retail establishments. *Poultry Science*, 87, 187-190.
- Moore, J.E., Wilson, T.S., Wareig, D.R.A., Humphrey, T.J. & Murphy, P.G. (2002). Prevalence of thermophilic *Campylobacter* spp. in ready-to-eat foods and raw poultry in Northern Ireland. *Journal of Food Protection*, 65 (8), 1326-1328.
- Moser, I., Riexneuwahner, B., Lentzsch, P., Schwerk, P., & Wieler, L.H. (2001). Genomic heterogeneity and O-antigenic diversity of *Campylobacter upsaliensis* and *Campylobacter helveticus* strains isolated from dogs and cats in Germany. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2548-2557.
- Nachamkin, I. (2002). Chronic effects of *Campylobacter* infection. *Microbes and Infection*, 4, 399-403.
- Nadeau, E., Messier, S. & Quessy, S. (2002). Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *Journal of Food Protection*, 65 (11), 73–78.
- Nakari, U.M., Puhakka, A. & Siitonen, A. (2008). Correct identification and discrimination between *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by a standardized hippurate test and species-specific polymerase chain reaction. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 513-518.
- Nauta, M., Hill, A., Rosenquist, H., Brynestad, S., Fetsch, A., van der Logt, P., Fazil, A., Christensen, B., Katsma, E., Borck, B. & Havelaar, A. (2009). A comparison of risk assessments on *Campylobacter* in broiler meat. *International Journal of Food Microbiology*, 1-17.
- Neimann, J., Engberg, J., Molbak, K. & Wegener, H.C. (2003). A case-control study of risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in Denmark. *Epidemiology and Infection*, 160, 353-366.
- Newell, D.G. & Wagenaar, J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. In: Nachamkin, I., Blaser, M.J. (Eds.), *Campylobacter* (2<sup>nd</sup> edition). Washington, D.C.: AMS Press.
- Newell, D.G. & Fearnley, C. (2003). Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8), 4343-4351.
- NP 4137 (1991). *Norma Portuguesa para Microbiologia Alimentar. Regras gerais para a determinação de Enterobacteriaceae sem revitalização. Técnicas do número mais*



provável (NMP) e de contagem de colónias. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.

- O'Brien, C.A., Crandall, P.G., Ricke, S.C. & Olson, D.G. (2008). Impact of irradiation on the safety and quality of poultry and meat products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 442-457.
- Ohara, M., Oswald, E. & Sugai, M. (2004). Cytolethal distending toxin: A bacterial bullet targeted to nucleus. *Journal of Biochemistry*, 136, 409-413.
- Oldfield, E.C. & Wallace, M.R. (2001). The role of antibiotics in the treatment of infectious diarrhea. *Gastroenterology Clinics of North America*, 30, 817-836.
- Oliveira, T.C., Barbut, S. & Griffiths, W. (2005). Detection of *Campylobacter jejuni* in naturally contaminated chicken skin by melting peak analysis of amplicons in real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 105-111.
- Olson, C.K., Ethelberg, S., Van Pelt, W. & Tauxe, R.V. (2008). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations. In: Nachamkin, I., Szymanski, C.M. & Blaser, M.J. (Eds). *Campylobacter* (2<sup>nd</sup> edition). ASM Press, Washington D.C.
- On, S. L.W (2005). Taxonomy, phylogeny, and methods for the identification of *Campylobacter* species. In *Campylobacter – Molecular and Cellular Biology*. Norfolk, United Kingdom: Horizon Bioscience.
- Oyarzabal, O. A., Macklin, K. S., Barbaree, J. M., Miller, R. S. (2005). Evaluation of agar plates for direct enumeration of *Campylobacter* spp. from poultry carcass rinses. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 3351-3354.
- Pattison, M. (2002). Practical intervention strategies for *Campylobacter*. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 121-125.
- Park, P. (2002). The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 74, 177-188.
- Pearce, R.A., Wallace, F.M., Call, J.E., Dudley, R.L., Oser, A. & Yoder, L. (2003). Prevalence of *Campylobacter* within a swine slaughter and processing facility. *Journal of Food Protection*, 66, 1550-1556.
- Pepe, T., De Dominicis, R., Esposito, G., Ventrone, I., Fratamico, P. M. & Cortesi, M.L. (2009). Detection of *Campylobacter* from poultry carcass skin samples at slaughter in Southern Italy. *Journal of Food Protection*, 72 (8), 1718-1721.
- Persson, S. & Olsen, K. (2005). Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal of Medical Microbiology*, 54, 1043-1047
- Petersen, M.C. (2003). *Campylobacter jejuni* enteritis associated with consumption of raw milk. *Journal of Environmental Health*, 65 (9), 20-21.
- Posh, J., Feierl, G., Wuest, G., Sixl, W., Schmidt, S., Haas, D.U., Reinthaler, F.F. & Marth, E. (2006). Transmission of *Campylobacter* spp. in a poultry slaughterhouse and genetic characterisation of the isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *British Poultry Science*, 47, 286-293.

- Potturi-Venkata, L. P., Backert, S., Lastovica, A. J., Vieira, S. L., Norton, R.A., Miller, R. S., Pierce, S. & Oyarzabal, O. A. (2007). Evaluation of different plate media for direct cultivation of *Campylobacter* species from live broilers. *Poultry Science* 86, 1304-1311.
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. & Leonard, F. C. (2002). *Campylobacter* species. In P.J. Quin & B.K. Markey (Eds), *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. (168-172). United Kingdom: Blackwell Science Ltd.
- Ridley, A. M., Allen, V. M., Sharma, M., Harris, J. A. & Newell, D. (2008). Real-time PCR approach for detection of environmental sources of *Campylobacter* strains colonizing broiler flocks. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (8), 2492-2504.
- Rivera-Amill, V., Kim, B.J., Seshu, J. & Konkel, M.E. (2001). Secretion of the virulence associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *Journal of Infectious Diseases*, 183, 1607-1616.
- Rudi, K., Hoidal, H. K., Katla, T., Johansen, B. K., , Nordal, J. & Jakobsen, K. S. (2004). Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 790-797.
- Sallam, K. (2007). Prevalence of *Campylobacter* in Chicken and chicken by-products retailed in Sapporo area, Hokkaido, Japan. *Food Control*, 18, 1113-1120.
- Sampers, I., Habib, I., Berkvens, D., Dumoulin, A., Zutter, L., Uyttendaele, M. (2008). Processing practices contributing to *Campylobacter* contamination in Belgian chicken preparations. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 297-303.
- Sanchez M.X., Fluckey, W.M., Brashears, M.M. & McKee, S.R. (2002). Microbial profile and antibiotic susceptibility of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp. in broilers processed in air-chilled and immersion-chilled environments. *Journal of Food Protection*, 65, 948-956.
- Sandberg, M., Nygard, K., Meldal, H., Steinar, V., P., Kruse, H., Sljerve, E., (2006). Incidence trend and risk factors for *Campylobacter* infections in humans in Norway. *BMC Public Health*, 6, 179.
- Shane, S.M. & Stern N.J. (2003). *Campylobacter* Infection. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry*, (11<sup>th</sup> Edition): Iowa, United States of America: Blackwell Publishing Company.
- Scherer K., Bartelt, E., Sommerfeld, C. & Hildebrandt, G. (2006). Quantification of *Campylobacter* on the surface and in the muscle of chicken legs at retail. *Journal of Food Protection*, 69, 757-761.
- Slader, J., Dominique, G., Jorgensen, F., McAlpine, K., Owen, R.J., Bolton, F.J. & Humphrey, T.J. (2002). Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens. *Applied of Environmental Microbiology*, 68, 713-719.
- Snelling, W.J., Matsuda, M., Moore, J:E. & Doodley, J.S. (2005). Under the microscope. *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 297-302.
- Son, I., Englen, M.D., Berrang, M.E., Fedorka-Cray, P.J & Harrison, M.A. (2007). Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on Broiler carcasses during processing. *International Journal of Food Microbiology*, 113 (1), 16-22.

- Stanley, K. & Jones, K. (2003). Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *Journal of Applied Microbiology* 94, 104S–113S.
- Stern, N.J., Fedorka-Cray, P., Bailey, J.S., Cox, N.A., Craven, S.E. & Hiett, K.L. (2001). Distribution of *Campylobacter* spp. in selected U.S. poultry production and processing operation. *Journal of Food Protection*, 64, 1705-1710.
- Stern N.J. & Robach, M.C. (2003). Enumeration of *Campylobacter* spp. in broiler faeces and in corresponding processes carcasses. *Journal of Food Protection*, 66 (9), 1557-1563.
- Stern N. J. & Pretanik, S. (2006). Counts of *Campylobacter* spp. on U.S. broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, 69, 1034-1039.
- Stern, N.J., Georgsson, F., Lowman, R., Bisailon, J.R., Reiersen, J., Callicott, K.A., Geirsdóttir, M., Hróldóttir, R. & Hiett, K.L. (2007). Frequency and enumeration of *Campylobacter* species from processed broiler carcasses by weep and rinse samples. *Poultry Science*, 86, 394-399.
- Studahl, A. & Andersson, Y. (2000). Risk factors for indigenous *Campylobacter* infection: a Swedish case-control study. *Epidemiology and Infection*, 125 (2), 269-275.
- Takkinen, J., Ammon, A., Robstad, O. & Breuer, T. (2003). European survey on *Campylobacter* surveillance and diagnosis 2001. *Eurosurveillance*, 8 (11). Acedido em Dez. 7, 2009, disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=430>.
- Temprado, R.M. (2005). Qualidade da carne de frango (Parte I). *Aves e Ovos*, 180, 14-21.
- Teunis, P.F. & Havelaar, A.H. (2000). The beta poisson dose-response model is not a single –hit model. *Risk Analysis*, 20, 513-520.
- Thakur, S. & Gebreyes, W.A. (2005). Prevalence and microbial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. *Journal of Food Protection*, 68, 2402-2410.
- Uyttendaele, M., Baert, K., Ghafir, Y., Daube, G., De Zutter, L., Herman, L., Dierick, K., Pierard D., Dubois, J. J., Horion, B. & Debevere, J. (2006) Quantitative risk assessment of *Campylobacter* spp. in poultry based meat preparations as one of the factors to support the development of risk-based microbiological criteria in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 149-163.
- Vandamme, P. (2000). Taxonomy of the family *Campylobacteraceae*. In I. Nachamkin & M.J. Blaser (Eds.), *Campylobacter* (2<sup>nd</sup> edition). (pp 3-44). Washington: ASM Press.
- Van der Sluis, W. (2002). Who is going to cook poultry and for whom? *World Poultry*, 17, 24-26.
- Veloso, M.G.L (1994). *Contribuição para o estudo de Campylobacter jejuni e Campylobacter coli em alimentos de origem animal em Portugal*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Venturini, K.S., Sarcinelli, M.F. & Silva, L.C. (2007). *Características da carne de frango*. Acedido a Nov. 28, 2009, disponível em: [http://www.agais.com/telomc/b01307\\_caracteristicas\\_carnefrango.pdf](http://www.agais.com/telomc/b01307_caracteristicas_carnefrango.pdf).





















- Vicente, A., Barros, R., Florinda, A., Silva, A. & Hanscheid, T. (2008). High rates of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in Portugal – Need for Surveillance. *Eurosurveillance*, 13, 1-2.
- Wang, G., Clark, C. G., Taylor, T. M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D. L. & Rodgers, F. G. (2002). Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 4744-4747.
- Wassenaar, T.M. (1997), Toxin Production by *Campylobacter* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 10 (3), 466-476.
- Wassenaar T. M. (2000).Molecular methods for detection, speciation and subtyping of *Campylobacter* spp. *Lohmann Information*, 24, 13-19.
- Wassenaar, T. & Newell, D. (2006). The genus *Campylobacter*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg & K. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes*. (pp. 119-138). New York, USA: Springer Science & Business Media, LLC.
- Wilson, D.J., Gabriel, E., Leatherbarrow, A.J.H., Cheesbrough, J., Gee, S., Bolton, E., Fox, A., Fearnhead, P., Hart, C.A. & Diggle, P.J. (2008). Tracing the source of campylobacteriosis. *PLoS Genetics*, 4 (9), 1-9.
- Wingstrand, A., Neimann, J., Engberg, J., Nielsen, E., M., Gerner-Smidt, P., Wegener, H. & Molbak, K. (2006). Fresh chicken as main risk factor for campylobacteriosis, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 12 (2), 280-284.
- Whyte, P., McGill, K., Cowley, D., Madden, R.H., Moran, L., Scates, P., Carroll, C., O’Leary, A., Fanning, S., Collins, J.D., McNamara, E., Moore, J.E. & Cormican, M. (2004). Occurrence of *Campylobacter* in retail foods in Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, 95, 111-118.
- Wolfs, p., Norling, B., Hoorfar, J., Griffiths, M. & Radstrom, P. (2005). Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken rinse samples by using flotation prior to real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 5759-5764.
- World Organisation for Animal Health [OIE] (2008). *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. In *OIE Terrestrial Manual*. Paris: OIE
- Yamazaki-Matsune, W., Taguchi, M., Seto, K., Kawahara, R., Kawatsu, K., Kumeda, Y., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N. & Tsukamoto, T. (2007). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *Hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 1467-1473.
- Zhao, C., Ge, B., De Villena, J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S. (2001). Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Salmonella*, serovars in retail chicken, turkey, pork and beef from the greater Washington D.C. area. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 5431-5436.

## **ANEXOS**

# **ANEXO I**

**Plano: Resumo das Operações de Limpeza e Desinfecção**

## Plano – Resumo das Operações de Limpeza e Desinfecção

	OPERAÇÃO		PRODUTO			°C		 Atenção	VÁLIDO PARA
Limpeza Diária Alcalina		D	ÁGUA			Ambiente	Até ficar visivelmente limpo		<b>FRANGOS – SALAS DE DESMANCHA/ EMBALAGEM/ MOELAS</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Paredes</li> <li>• Pavimentos</li> <li>• Máquinas</li> <li>• Outros</li> </ul>
		D	SUPERVIX A		3%	40-50°C	10/15 minutos		
		D	ÁGUA			Ambiente	Até eliminação completa do detergente		
Limpeza Semanal Ácida		S	DESOCAL FOAM		2%	40-50°C	Mínimo 20 minutos		<b>MEDIDAS DE SEGURANÇA</b>
		S	ÁGUA			Ambiente	Até ficar visivelmente limpo		  
Desinfecção Semanal		S	PRODESIN 3		0,5%	Ambiente	10/15 minutos		
		S	ÁGUA			Ambiente	Até ficar visivelmente limpo		